



**Aalto-yliopisto**  
Kemian tekniikan  
korkeakoulu

**Kemian tekniikan korkeakoulu**  
**Kemian tekniikan koulutusohjelma**

**Johanna Pennanen**

## **FERMENTOINNIN KINEETTINEN MALLI**

**Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-insinöörin tutkintoa varten Espoossa 19.10.2015.**

**Valvoja**

**Professori Ville Alopaeus**

**Ohjaajat**

**Tekniikan tohtori Tero Eerikäinen**

**Tekniikan tohtori Ilkka Malinen**

---

**Tekijä** Johanna Pennanen

---

**Työn nimi** Fermentoinnin kineettinen malli

---

**Laitos** Biotekniikan ja kemian tekniikan laitos

---

**Professuuri** Kemian laitetekniikka

---

**Professuurikoodi** Kem-42

---

**Työn valvoja** Ville Alopaeus

---

**Työn ohjaaja(t)/Työn tarkastaja(t)** Tero Eerikäinen, Ilkka Malinen

---

**Päivämäärä** 19.10.2015

---

**Sivumäärä** 101+27

---

**Kieli** Suomi

---

### Tiivistelmä

Tämän työn tarkoituksena on löytää etanolifermentoinnin prosessisimulointiin soveltuva kineettinen malli. Fermentoivaksi mikrobiksi oletetaan *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva. Mallinnus suoritetaan Aspen Plus -prosessi-simulointiohjelmistolla ja kuvattava fermentointi suoritetaan panostoimisesti. Mallien parametrien sovitukset suoritetaan kahden panosfermentoinnista kerätyn mittausdatan perusteella.

Kirjallisuudesta on saatavilla erilaisiin mikrobikasvua ja etanolintuotantoa rajoittaviin tekijöihin perustuvia malleja. Simulointien perusteella laadukkaimmat sovitukset käytettyihin datoihin saadaan Levenspielin, Luongin ja Aiban lopputuoteinhibitomalleilla, mutta sovitukseen jää silminhavaittava virhe jokaisen mallin kohdalla. Tulosten perusteella fermentoinnin kineettisten mallien sovittaminen koedataan on haastavaa. Koedatan vähäisyyden ja puutteellisuuden vuoksi tuloksia voidaan pitää ainoastaan suuntaa-antavina.

Tarkemman simulointimallin rakentamiseksi vaaditaan riittävästi kaikkien fermentointisysteemin sisältämien komponenttien pitoisuudet sisältävää mittausdataa. Eri olosuhteissa ja erilaisilla komponenttien alkupitoisuuksilla suoritettavien fermentointien mallintamiseksi on kerättävä dataa kyseisissä olosuhteissa ja sovitettava parametrit jokaiselle tutkittavalle tapaukselle. Kaikkien fermentoinnin aikana kuluviin ja muodostuviin komponenttien reaktionopeuksien kuvaamiseksi vaaditaan jokaiselle komponentille erillinen kineettinen malli.

Mallinnuksen oikeellisuuteen vaikuttaa olennaisesti, kuinka tarkasti hiivakomponentti kyetään mallintamaan. Mahdollisimman tarkan mallin luomiseksi hiiva on kuvattava pseudokomponenttina, joka sisältää hiilen, vedyn ja hapen lisäksi typen ja muut hiivan kasvuunsa kuluttamat ravinteet.

---

**Avainsanat** Fermentointi, kineettinen malli, bioetanoli, hiiva

---

---

**Author** Johanna Pennanen

---

**Title of thesis** Kinetic Model of Fermentation

---

**Department** Biotechnology and Chemical Technology

---

**Professorship** Chemical Engineering

**Code of professorship** Kem-42

---

**Thesis supervisor** Ville Alopaeus

---

**Thesis advisor(s) / Thesis examiner(s)** Tero Eerikäinen, Ilkka Malinen

---

**Date** 19.10.2015

**Number of pages**

**Language** Finnish

101+27

---

### Abstract

The objective of this thesis is to discover a kinetic model applicable to process simulation of ethanol fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* is assumed as a fermentative microorganism. Modelling is performed by Aspen Plus process simulation software. The modelled fermentation process is operated batchwise. The model parameters are fitted to two datasets obtained from batch fermentation experiments.

There is a variety of kinetic models available in the literature based on different assumptions of microbial growth and ethanol production limiting factors. Simulations indicate the best fitted curves resulting from Levenspiel's, Luong's and Aiba's product inhibition models. However, the error between the three models and the data is evident. Based on the results, fitting kinetic fermentation models to data is challenging. The results of this study may be considered as approximate due to limited amount and insufficiency of the experimental data.

To formulate more rigorous fermentation model, data including concentrations of each component in the fermentation solution is required. To model fermentation in different conditions and in different initial concentrations of the components, data obtained in different experimental conditions is required. Parameter fitting is required for every data set. Kinetics of each component utilized or formed during the fermentation process is required to be included in the kinetic model to specify reaction rates.

The precision of the model of yeast component affects the validity of the fermentation model. The best validity may be obtained by modelling yeast as pseudo component containing carbon, hydrogen and oxygen along with nitrogen and other nutrients utilized in its growth.

---

**Keywords** Fermentation, kinetic model, bioethanol, yeast

---

## **Esipuhe**

Tämä diplomityö on kirjoitettu Aalto yliopiston Kemian tekniikan korkeakoulun Biotekniikan ja kemian tekniikan laitoksella. Tahdon kiittää kaikkia tämän projektin sidosryhmiä mahdollisuudesta työskennellä antoisan ja mielenkiintoisen aiheen parissa.

Kiitän valvojaani professori Ville Alopaeusta, jonka ansiosta Fortran-aliohjelman linkitys Aspeniin saatiin toimimaan niin, että työn mallinnusosuus saattoi alkaa. Kiitän ohjaajaani, opettavaa tutkijaa Tero Eerikäistä avusta ja neuvoista erityisesti työn mikrobiologiaan liittyvissä kysymyksissä. Ohjaajaani Ilkka Malista kiitän erinomaisesta avusta simulointivaiheen ja työn viimeistelyn aikana. Kiitän myös Pasi Hagelbergiä, Jyri Maunukselaa ja Heikki Ojamaa, jotka tarjosivat tietämystään ja tukea tälle projektille. Kristian Meliniä kiitän opastuksesta Aspenin käytössä. Teidän ansiostanne olen oppinut valtavasti uutta fermentoinnista ja sen mallinnuksesta.

Lopuksi kiitän lämpimästi vanhempiani, isoveljeäni, ystäviäni ja sukulaisiani, jotka ovat kulkeneet vierelläni tämän projektin ja koko elämäni aikana. Olette korvaamattomia.

Espoo, lokakuu 2015

Johanna Pennanen

# Sisällys

## Symboliluettelo

1	Johdanto.....	1
2	Lignoselluloosahydrolysaatti.....	3
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -hiiva fermentoivana mikrobina.....	4
3.1	Kasvun vaiheet.....	5
3.2	Metabolia .....	7
3.2.1	Aerobinen metabolia.....	8
3.2.2	Anaerobinen metabolia.....	9
3.2.3	Glukoosin säätelyvaikutus metaboliaan.....	15
3.2.4	Hapen säätelyvaikutus metaboliaan .....	15
3.2.5	Hiilenlähteen vaikutus metaboliaan.....	16
3.2.6	Ylläpitoilmiö .....	17
3.2.7	Varastohiilihydraattien tuotanto.....	18
4	Fermentointiprosessin ajotavat .....	18
4.1	Panosfermentointi.....	20
4.2	Panossyöttöfermentointi .....	22
4.3	Jatkuvatoiminen fermentointi.....	23
4.4	Solujen immobilisointi .....	25
5	Fermentoinnin parametrit .....	25
5.1	Lämpötila .....	26
5.2	pH .....	29
5.3	Substraattipitoisuus.....	32
5.4	Ravinteet .....	34

5.5	Liuenut happi.....	35
5.6	Sivutuotteet.....	35
5.7	Osmoottinen paine.....	36
6	Inhibitio .....	36
6.1	Biomassan aiheuttama inhibitio.....	36
6.2	Substraatti-inhibitio.....	37
6.3	Lopputuoteinhibitio.....	37
6.4	Heikot hapot inhibiittoreina .....	38
6.5	Furaanijohdannaiset ja fenolit inhibiittoreina .....	41
7	Fermentoinnin kineettiset mallit .....	43
7.1	Spesifiset nopeudet ja saantokertoimet .....	44
7.2	Solukasvun black box -malli.....	45
7.3	Eksponentiaalisen kasvun laki .....	46
7.4	Strukturoimattomat kineettiset mallit .....	46
7.5	Monodin malli .....	48
7.6	Monodin mallin johdannaiset .....	49
7.6.1	Ylläpitoilmiö .....	49
7.6.2	Biomassan aiheuttama inhibitio.....	50
7.6.3	Substraatti-inhibitiomallit .....	50
7.6.4	Lopputuoteinhibitiomallit .....	52
7.6.5	Yhdistetyt substraatti- ja lopputuoteinhibitiomallit .....	54
7.6.6	Epäaktiivisten solujen vaikutus .....	55
7.7	Moserin malli.....	55
7.8	Tessierin malli.....	56
7.9	Logistinen malli.....	56
7.10	Kineettisten mallien lämpötilariippuvuus.....	57

8	Fermentointimallin rakentaminen prosessisimulointiohjelmistolla.....	61
8.1	Simulointityökalu.....	61
8.2	Fermentoinnissa esiintyvien komponenttien kuvaus .....	61
8.3	Fermentointilaitteisto ja virtauskaavio simulointimallissa .....	63
8.4	Fermentoinnin esittäminen reaktioyhtälöllä .....	64
8.5	Mallien sovittamiseen käytettävä fermentointikoedata .....	65
8.6	Kineettisten mallien sovittaminen mittausdataan.....	71
8.6.1	Monodin malli .....	74
8.6.2	Moserin, Contoisen ja Tessierin mallit .....	75
8.6.3	Substraatti-inhibitiomallit .....	76
8.6.4	Yhdistetyt substraatti- ja lopputuoteinhibitiomallit .....	77
8.6.5	Lopputuoteinhibitiomallit .....	77
8.6.6	Mallien vertailu.....	79
8.7	Virhearviointi .....	88
9	Johtopäätökset ja jatkotutkimusehdotukset .....	90
	Viitteet.....	94

## LIITTEET

Liite 1. Fortranilla luotujen käyttäjämallien liittäminen Aspen Plus -simulaattoriin

Liite 2. Fortran-koodi kinetiikalle

Liite 3. Malleille sovitettujen parametrien arvot

Liite 4. Malleille sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisit

## Symboliluettelo

$a$	Yhtälön parametri	$\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$A$	Lämpötilariippuvuuden vakio	-
$a_1$	Ratkowskyn parametri	$1 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1} \text{ h}^{-0,5}$
$A_{G1}$	Aktivaatioenergia glyserolituotannolle jaettuna R:lla	$^{\circ}\text{C}$
$A_{G2}$	Inaktivaatioenergia glyserolituotannolle jaettuna R:lla	$^{\circ}\text{C}$
$A_i$	Arrheniuksen mallin parametri	$\text{mmol C-mol}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$
$A_{P1}$	Aktivaatioenergia etanolituotannolle jaettuna R:lla	$^{\circ}\text{C}$
$A_{P2}$	Inaktivaatioenergia etanolituotannolle jaettuna R:lla	$^{\circ}\text{C}$
$b$	Yhtälön parametri	$\text{L/g}$
$B$	Lämpötilariippuvuuden vakio	-
$b_1$	Ratkowskyn parametri	$1 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$
$b_i^*$	Ratkowskyn mallin empiirinen parametri	$\text{mmol}(\text{C-mol}_x \text{ h K}^2)^{-1}$
$C$	Lämpötilariippuvuuden vakio	-
$D$	Laimennusnopeus	$\text{h}^{-1}$
$D$	Lämpötilariippuvuuden vakio	-
$E_{ai}$	Arrheniuksen mallin aktivoitumisenergia	$\text{J mol}^{-1}$
$F$	Syöttövirta	$\text{L/h}$
$F_0$	Fermentorin syöttövirta	$\text{L/h}$
$F_{ulos}$	Ulostulovirta	$\text{L/h}$
$j$	Empiirinen luku	-
$k_1$	Solujen kuolemisnopeuslausekkeen parametri	-
$k_2$	Solujen kuolemisnopeuslausekkeen parametri	$\text{h}^{-1}$
$K_{db}$	Spesifinen solujen peruskuolemisnopeus	$\text{h}^{-1}$
$K_{dt}$	Solujen lämpötilariippuvainen maksimikuolemisnopeus	$\text{h}^{-1}$
$K_i$	Substraatti-inhibitiokerroin solukasvulle	$\text{g/L}$



$K_i$	Substraatti-inhibitiokerroin	L/g
$K_{IP}$	Substraatti-inhibitiokerroin etanolituotannolle	g/L
$K_P$	Etanoli-inhibitiokerroin solukasvulle	g/L
$K_{PP}$	Etanoli-inhibitiokerroin etanolituotannolle	g/L
$K_{SP}$	Substraatin saturaatiovakio etanolituotannolle	g/L
$K_{SX}$	Substraatin saturaatiovakio spesifiselle kasvunopeudelle	g/L
$m$	Ylläpitovakio	$g\ g_{solut}^{-1}\ h^{-1}$
$m_P$	Ylläpitovakio tuotteenmuodostuksessa	$g\ g_{solut}^{-1}\ h^{-1}$
$m_S$	Ylläpitovakio biomassan kasvussa	$g\ g_{solut}^{-1}\ h^{-1}$
$n$	Eksponenttiparametri kineettisessä mallissa	-
$P$	Tuotekonsentraatio	g/L
$P^*$	Saturaatiovakio etanolipitoisuudelle	g/L
$P^f$	Syötön tuotekonsentraatio	g/L
$P_{Pmax}$	Etanolin tuotantonopeutta rajoittava etanolipitoisuus	g/L
$P_{xmax}$	Biomassan kasvunopeutta rajoittava etanolipitoisuus	g/L
$q_G$	Glyserolin spesifinen muodostumisnopeus	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
$q_P$	Etanolin spesifinen muodostumisnopeus	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
$R$	Moolinen kaasuvakio	$kJ\ K^{-1}\ mol^{-1}$
$r_d$	Solujen kuolemisnopeus	$g\ L^{-1}\ h^{-1}$
$r_P$	Tuotteen muodostumisnopeus	$g\ L^{-1}\ h^{-1}$
$r_S$	Substraatin kulutusnopeus	$g\ L^{-1}\ h^{-1}$
$r_X$	Biomassan kasvunopeus	$g\ L^{-1}\ h^{-1}$
$S$	Substraatti	g/L
$S^*$	Saturaatiovakio substraattipitoisuudelle	g/L
$S_0$	Substraatin alkupitoisuus fermentorissa	g/L
$S^f$	Substraatti syötössä	g/L
$S_I$	Biomassan kasvunopeutta rajoittava substraattipitoisuus	g/L

$S_{IP}$	Etanolin tuotantonopeutta rajoittava substraattipitoisuus	g/L
$t$	Aika	h
$T$	Lämpötila	°C tai K
$T_{min,i}$	Ratkowskyn mallin empiirinen parametri	°C
$V$	Reaktoritilavuus	L
$X$	Biomassa	g/L
$X_d$	Kuolleiden solujen konsentraatio	g/L
$X_f$	Biomassakonsentraatio syötössä	g/L
$X_l$	Reaktorin biomassakonsentraatio	g/L
$X_{loppu}$	Biomassan loppukonsentraatio fermentorissa	g/L
$X_{max}$	Biomassan maksimipitoisuus	g/L
$X_t$	Biomassan konsentraatio ajanhetkellä $t$	g/L
$X_t$	Solujen kokonaiskonsentraatio	g/L
$X_v$	Elävien solujen konsentraatio	g/L
$Y_{GS}$	Glyserolin saanto sokerista	$g\ g^{-1}$
$Y_{PS}$	Etanolin saanto sokerista	$g\ g^{-1}$
$Y_{PX}$	Etanolin saanto biomassasta	$g\ g^{-1}$
$Y_{XS}$	Biomassasaanto substraatista	$g\ g^{-1}$
$Y_{XS}^{tod}$	Todellinen biomassan saanto substraatista	$g\ g^{-1}$
$Y_{XS}^{tot}$	Kokonaisbiomassasaanto substraatista	$g\ g^{-1}$
$\alpha$	Empiirinen eksponentti kineettisessä mallissa	-
$\alpha_G$	Kasvuun liittyvä parametri	-
$\alpha_P$	Kasvuun liittyvä parametri	-
$\beta$	Empiirinen eksponentti kineettisessä mallissa	-
$\beta_G$	Jakautumisvakio	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
$\beta_P$	Jakautumisvakio	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
$\gamma_1$	Jakautumisvakio etanolituotannolle	$g\ g_x^{-1}\ h^{-1}$

$\gamma_2$	Jakautumisvakio etanolituotannolle	$g\ g_x^{-1}\ h^{-1}$
$\gamma_3$	Jakautumisvakio etanolituotannolle	$g\ g_x^{-1}\ h^{-1}$
$\gamma_4$	Jakautumisvakio etanolituotannolle	$g\ g_x^{-1}\ h^{-1}$
$\theta_1$	Vakio	$^{\circ}C$
$\theta_2$	Vakio	$^{\circ}C$
$\theta_3$	Lämpötila $K_d = f(T)$ -käyrän käännepestessä	$^{\circ}C$
$\theta_4$	$K_d = f(T)$ -käyrän kulmakerroin	$^{\circ}C^{-1}\ h^{-1}$
$\mu$	Biomassan spesifinen kasvunopeus	$h^{-1}$
$\mu_{max}$	Biomassan maksimispesifinen kasvunopeus	$h^{-1}$

# 1 Johdanto

Korvaamalla polttoaineseoksen fossiilisesta öljystä valmistettuja jakeita kokonaan tai osittain bioetanolilla, saadaan aikaan kestävä kehityksen periaatteet paremmin täyttäviä liikennepolttoaineita. Ensimmäisen sukupolven bioetanolin raaka-aineiden tuotanto kilpailee peltopinta-alasta ruoantuotannon ja karjarehun kasvatuksen kanssa. Ratkaisuna tähän on lignoselluloosaperäisen biomassan käyttö bioetanolin raaka-aineena. (Larsen *et al.*, 2008)

Lignoselluloosaraaka-aineen fermentointiprosessin toteuttaminen taloudellisesti kannattavasti on haastavaa. (Larsen *et al.*, 2008) Kannattavan tuotantoprosessin toteuttamiseksi on tunnettava fermentoivan organismin kasvu- ja etanolintuotantokinetiikka. (Phisalaphong *et al.*, 2006) Fermentoinnin mallintamiseksi on kehitetty kineettisiä malleja, jotka perustuvat erilaisiin oletuksiin systeemissä vallitsevan inhibition tyypistä ja organismin aineenvaihduntaa rajoittavista tekijöistä. (El-Mansi *et al.*, 2007)

Prosessisimulointimallin luomiseksi on tunnettava eri parametrien, kuten lämpötilan, pH:n ja eri komponenttien konsentraatioiden, vaikutus fermentoivan organismin kasvuun ja aineenvaihduntatuotteiden muodostamiseen. Lignoselluloosaperäisen bioetanolituotannon mallinnuksessa on huomioitava lisäksi raaka-aineen sisältämien inhibiittoreiden ja toksiinien vaikutus fermentoivan organismin toimintaan.

Tässä työssä fermentoivaksi organismiksi on valittu *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva, jonka kasvun vaiheita ja metaboliaa, sekä toimintaan vaikuttavia parametreja työssä esitellään. Työn tavoitteena on testata erilaisten strukturoimattomien kineettisten mallien soveltuvuutta etanolifermentoinnin kuvaamiseen. Fermentointia mallinnetaan tässä työssä Aspen-prosessisimulointiohjelmistolla perinteisenä etanolifermentointina, jonka raaka-aineena toimii puhdas glukoosi. Jotta lignoselluloosafermentointia kyettäisiin kuvaamaan luotettavasti, tarvitaan lisätutkimusta ja kokeellista toimintaa, joihin tämän työn kokemusten ja tulosten pohjalta annetaan suosituksia.

# Kirjallisuusosa

## 2 Lignoselluloosahydrolysaatti

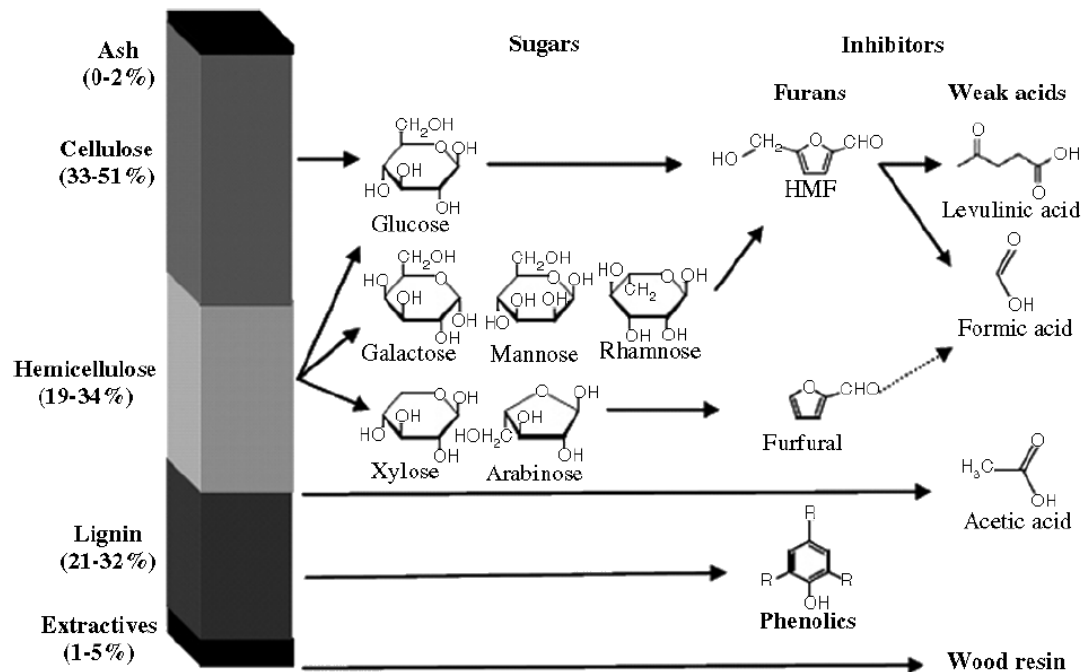
Tässä työssä tarkasteltavassa fermentoinnissa fermentoinnin hiilenlähteenä käytetään havupuusta, kuten männystä, tuotettavaa hydrolysaattia. Yleisesti runkopuusta 40 %:a on selluloosaa, 25–35 %:a hemiselluloosaa, 20–30 %:a ligniiniä, alle 5 %:a uuteaineita ja alle 0,5 %:a epäorgaanisia aineita. Edellä mainituista selluloosan, hemiselluloosan ja ligniinin muodostamaa seosta kutsutaan lignoselluloosaksi. Puun koostumukseen vaikuttavat mm. puulaji ja kasvuolosuhteet. (Alén, 2000)

Bioetanolin valmistamiseksi lignoselluloosa käsitellään fermentoitavaan muotoon. Tämä suoritetaan esikäsittelemällä seos ja hydrolysoimalla se, eli muuntamalla selluloosa ja hemiselluloosa sokereiksi. Esikäsitteilyssä ligniini erotetaan selluloosasta ja selluloosan kiteinen rakenne hajotetaan hydrolyysiprosessia varten. Hydrolyysin aikana hiilihydraattiketjuja pilkotaan monomeerisiksi sokereiksi. Sokereiden ohella hydrolyysissä syntyy furaaneja, heikkoja happoja ja fenoleita. Hydrolyysi voidaan suorittaa käyttäen laimeaa happoa, väkevää happoa tai entsyymejä. (Kumar *et al.*, 2009)

Selluloosa hydrolysoituu D-glukoosiksi. Hemiselluloosa hydrolysoituu D-glukoosiksi, D-galaktoosiksi, D-mannoosiksi, D-ramnoosiksi, D-ksyloosiksi ja L-arabinoosiksi. Monomeerisokereiden ohella hemiselluloosasta muodostuu uronihappoihin luokiteltavia glukuronihappoa ja 4-O-metyyloglukuronihappoa. Ligniinistä ja monomeerisokereista voi hydrolysoinnin aikana muodostua furaanijohdannaisia, heikkoja happoja ja fenoliyhdisteitä. Furaanijohdannaisiin kuuluvat 2-furaldehydi (furfuraali) ja 5-hydroksimetyyli-2-furaldehydi (HMF). Heikkoja happoja ovat etikkahappo, muurahaishappo ja levuliinihappo. Lukuisiin hydrolysaatissa esiintyviin fenoleihin kuuluvat esimerkiksi vanilliini, syringaldehydi ja katekoli. Hydrolysaatin koostumus vaihtelee raaka-aineen mukaan. (Almeida *et al.*, 2007)

Kuvassa (1) on esitetty rakenneaineiden massaosuudet keskimääräisessä puuperäisessä lignoselluloosassa, sekä niiden hydrolysoinnin tuloksena saatavat komponentit. (Almeida *et al.*, 2007) Suurin osa hydrolysoinnissa syntyvistä kuusi-

hiilisistä heksoosisokereista on glukoosia. Viisihiilisistä pentoosisokereista runsaimmin esiintyy ksyloosia. (Paulová *et al.*, 2014)



Kuva 1. Yleinen lignoselluloosabiomassan keskimääräinen koostumus ja sen hydrolyysissä syntyvät tuotteet. (Almeida *et al.*, 2007).

### 3 *Saccharomyces cerevisiae* -hiiva fermentoivana mikrobina

Etanolia aineenvaihduntansa päätuotteena tuottaviin mikro-organismeihin kuuluu sieniä, hiivoja ja bakteereita (Lin ja Tanaka, 2006). Fermentointiteollisuudessa käytetyin organismi on hiivoihin kuuluva *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Almeida *et al.*, 2007). *S. cerevisiae* on määritelty ihmiselle vaarattomaksi (Lin ja Tanaka, 2006). Tämän vuoksi se soveltuu käytettäväksi leiviniivana (baker's yeast) ja panimohiivana (brewer's yeast). (Madigan *et al.*, 2009, luku 1)

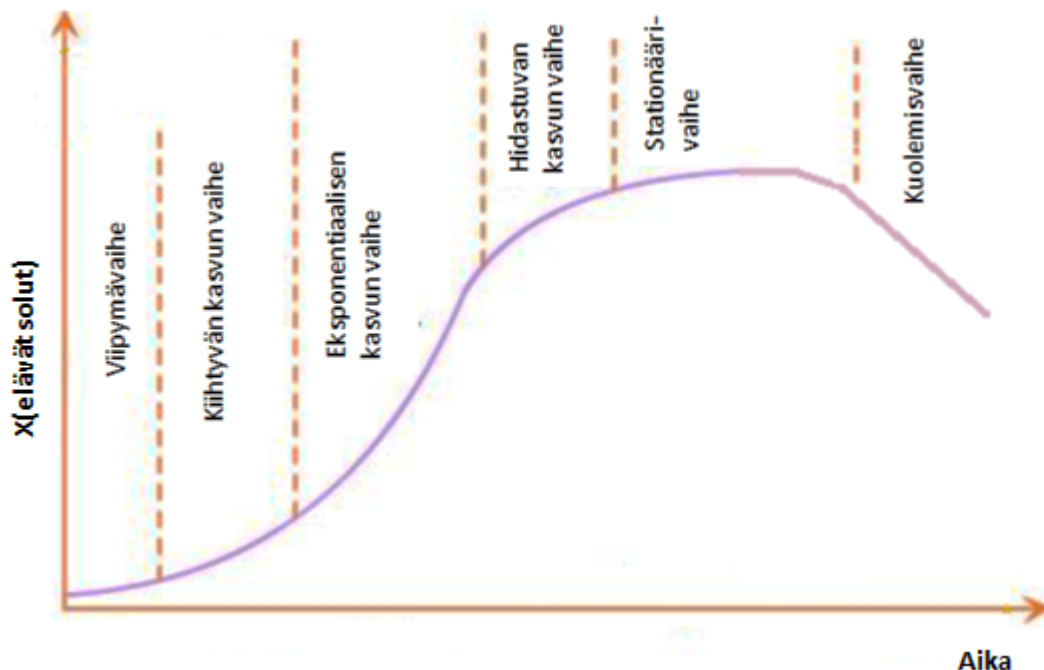
Koska furaanit, heikot hapot ja fenolit inhiboivat solujen kasvua ja etanolintuotantoa, lignoselluloosahydrolysaatin fermentoimiseen vaaditaan näiden yhdisteiden aiheuttamaa inhibitiota sietävä organismi. Lignoselluloosahydrolysaatin fermentointiin soveltuvia mikro-organismeja on etsitty bakteerien ja hiivojen joukosta. Kaikista

tutkituista lignoselluloosahydrolysaattia fermentoivista mikro-organismeista sietokykyisin hydrolysaatin sisältämiä inhibiittoreita vastaan on *S. cerevisiae*, joka on valittu tämän työn fermentoivaksi organismiksi. (Almeida *et al.*, 2007)

### 3.1 Kasvun vaiheet

Mikrobikasvuprosessia kuvataan kasvukäyrällä, jossa solujen lukumäärän muutos esitetään ajan funktiona. Tyypillisesti solujen lukumäärä esitetään logaritmisella asteikolla. (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3)

Panoskasvatuksessa mikrobikasvu koostuu kahdeksasta vaiheesta, joita ovat viipymävaihe, kiihtyvän kasvun, eksponentiaalisen (logaritmisen) kasvun ja hidastuvan kasvun vaiheet, stationäärivaihe, kiihtyvän kuoleman ja eksponentiaalisen kuoleman vaiheet, sekä selviytymis- tai kuolemisvaihe. Organismin spesifinen kasvunopeus vaihtelee näiden vaiheiden aikana. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 2) Kuvassa (2) on esitetty nämä kasvun vaiheet panostoisimissa kasvatuksessa siten, että kuolemisvaiheessa ei ole esitetty kiihtyvää tai eksponentiaalista vaihetta. (Díaz-Montaño, 2013, luku 8)



Kuva 2. Hiivan kasvun vaiheet panoskasvatuksessa. (Díaz-Montaño, 2013, luku 8)



Kasvun alussa esiintyvän viipymävaiheen aikana organismi sopeutuu muuttuneeseen ympäristöönsä tunnistamalla alustan komponentit ja syntetisoimalla komponenttien pilkkomiseen tarvittavat entsyymit ja solun sisälle kuljettamiseen tarvittavat proteiinit. (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3) Viipymävaiheessa solumassan määrä ei muutu. Viipymävaihe voi esiintyä useammin kuin kerran saman ajon aikana, kun kasvu-liuoksessa on useita eri hiilenlähteitä. Organismi kuluttaa ensiksi yhden lähteen loppuun ja siirtyy sitten kuluttamaan seuraavaa. Siirryttäessä hiilenlähteestä seuraavaan, hiivan täytyy sopeuttaa metaboliensa uuteen hiilenlähteeseen. Tällöin kyseessä on diauxie-ilmiö (diauxic growth), joka esitellään tämän työn luvussa 3.2.5. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 2)

Hiivoilla viipymävaihe voi kestää useita tunteja riippuen siitä, kuinka merkittävä muutos kasvu-ympäristössä on tapahtunut siirrettäessä kasvatussäiliöstä fermentoriin. (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3) Viipymävaiheen pituus fermentoinnissa riippuu mikrobikasvuston koosta ja iästä, sekä ravinnepitoisuudessa tapahtuvasta muutoksesta siirrostettaessa. Viipymävaiheen keston minimoimiseksi populaatio siirrostetaan fermentoriin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. (Bailey ja Ollis, 1986. Luku 7)

Siirryttäessä viipymävaiheesta eksponentiaaliseen vaiheeseen vallitsee kiihtyvän kasvun vaihe, jossa kasvukäyrä on loivempi kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 2) Koska tavallisesti kaikki solut eivät ole jakautumiskykyisiä heti viipymävaiheen jälkeen, solujen kasvunopeus ei saavuta välittömästi maksimi-arvoa. Kiihtyvän kasvun vaiheeksi kutsutaan tätä vaihetta, jonka aikana kasvunopeus kohoaa maksimiarvoon. (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3)

Eksponentiaalisessa vaiheessa solujen kasvu ja jakaantuminen tapahtuvat rajoitteitta. Eksponentiaalisessa vaiheessa solumassan  $X$  spesifisen kasvunopeuden  $\mu$  ollessa vakio, spesifiselle kasvunopeudelle pätee yhtälö (1).

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t}, \quad (1)$$

missä  $X_t$  on biomassakonsentraatio ajanhetkellä  $t$  [g/L] ja  $t$  on kasvatusaika [h]. (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3)

Hidastuvan kasvun vaiheessa jokin kasvuliuoksen ravinteista loppuu tai jonkin tuotteen pitoisuus saavuttaa kasvua inhihoivan tason. Solujen kasvu hidastuu tällöin. (Aittomäki *et al.*, 2002)

Stationäärivaiheessa populaatio on saavuttanut maksimikokonsa. (Bailey ja Ollis, 1986, luku 7) Solumassan määrä pysyy tällöin vakiona. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 2) Tyypillisesti vaiheen pituus on hyvin lyhyt. (Aittomäki *et al.*, 2002)

Kuolemisvaiheessa solut hajoavat ja vapauttavat kasvuliukseen ravinteita. Elävät solut voivat vielä hyödyntää näitä ravinteita ja kasvaa hitaasti. (Aittomäki *et al.*, 2002) Biomassan kasvua heikentää ravinteiden puute. Kuolemisvaiheen käyrän jyrkkyyteen vaikuttaa organismin kyky sopeutua ravinnonpuutteeseen. *S. cerevisiae* kykenee sopeuttamaan metaboliaansa niukkaan ravinnonsaantiin. Ylläpito- tai selviytymisvaiheessa solumassan määrä vakioituu, ja solujen käytössä on energiaa määrä, jolla ne kykenevät pitämään yllä elintoimintojaan, mutta jolla kasvua ei tapahdu. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 2) Kuolemisvaiheessa solumassan väheneminen on tavallisesti eksponentiaalista. (Bailey ja Ollis, 1986, luku 7)

Fermentoinnissa tavoitteena on usein maksimoida eksponentiaalisen kasvuvaiheen nopeus ja kesto. Viipymävaiheen pituus pyritään minimoimaan. (Bailey ja Ollis, 1986, Luku 7)

### **3.2 Metabolia**

*S. cerevisiae* on metabolialtaan fakultatiivinen, eli sen metabolia vaihtelee fermentatiivisen ja respiratiivisen välillä käytettävissä olevan hapen määrän mukaan. Mitä enemmän kasvuliuksessa on saatavilla happea, sitä aktiivisempänä hiivan respiratiivinen metaboliareitti on. (Dashko *et al.*, 2014)

Hiiva käsittelee glukoosia kolmen metaboliareitin kautta, joita ovat fermentointi, glukoosin hapetus ja etanolin hapetus (Simpson *et al.*, 2008). Fermentointia tapahtuu pääasiassa hiivan anaerobisessa metaboliassa, mutta olosuhteista riippuen fermentoitumista voi tapahtua myös aerobisen metabolian aikana. (Dashko *et al.*,

2014) Hapetusreaktiot ovat osa aerobista aineenvaihduntaa (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

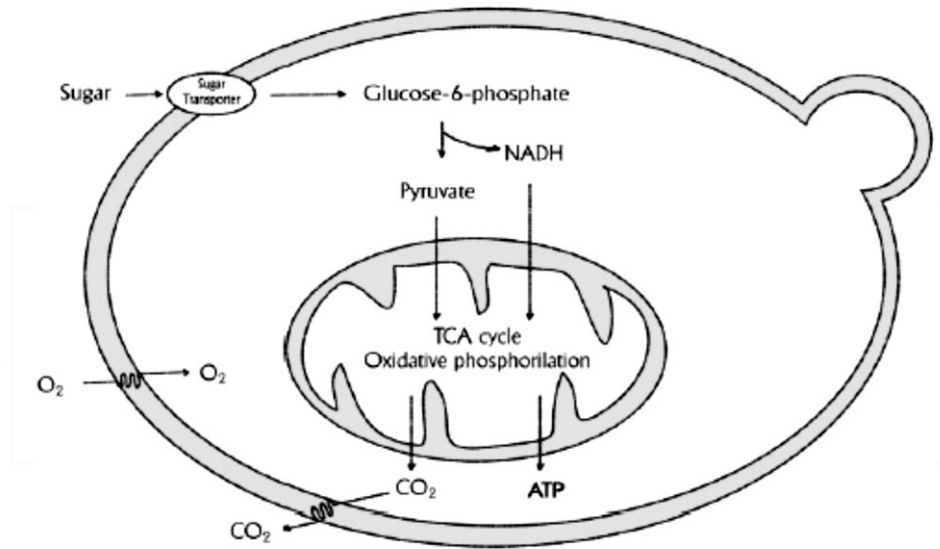
### 3.2.1 Aerobinen metabolia

Aerobisen eli respiratiivisen metabolian aikana hiiva kuluttaa happea ja käyttää energianlähteenä heksoosi- ja pentoosisokereita, alkoholeja ja orgaanisia happoja. (Juvonen *et al.*, 2001) Aerobisen metabolian tuotteina syntyy biomassaa, vettä, hiilidioksidia ja etanolia. Lisäksi voi muodostua sivutuotteita, kuten glyserolia. Hiivan aerobisen metabolian black box -stoikiometria on esitetty yhtälössä (2). (Nielsen *et al.* 2003, luku 3)

$$-CH_2O - Y_{NS}NH_3 - Y_{OS}O_2 + Y_{CS}CO_2 + Y_{PS}CH_3O_{0,5} + Y_{WS}H_2O + Y_{XS}CH_{1,83}O_{0,56}N_{0,17} + Y_{GS}CH_{2,67}O = 0 \quad (2)$$

Yhtälössä (2) saantokertoimet  $Y_{NS}$ ,  $Y_{OS}$ ,  $Y_{CS}$ ,  $Y_{PS}$ ,  $Y_{WS}$ ,  $Y_{XS}$  ja  $Y_{GS}$  toimivat stoikiometrisina kertoimina ammoniakille, hapelle, hiilidioksidille, etanolille, vedelle, biomassalle ja glyserolille. Vertailukomponenttina käytetään hiilenlähdettä (glukoosia) ja komponenttien molekyylikaavat on esitetty hiilen suhteen normalisoituina bruttokaavoina. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 3)

Respiratiivinen aineenvaihdunta muuntaa sokerista syntyneen pyruvaatin asetyylikoentsyymi-A:ksi, jolloin sitruunahappokierto (TCA-kierto) käynnistyy. Sitruunahappokierron aikana vapautuu energiaa hapetusreaktioiden myötä adensiinitrifosfaatin (ATP) muodossa. Yksinkertaistettu kaavio hiivan aerobisesta aineenvaihdunnasta on esitetty kuvassa (3). (Faria-Oliveira *et al.*, 2013)



Kuva 3. Hiivan aerobinen aineenvaihdunta. (Faria-Oliveira *et al.*, 2013)

Kun glukoosia on kasvuliuoksessa runsaasti, pyruvaattia muodostuu niin suuri määrä, ettei kaikki pyruvaatti kulkeudu sitruunahappokiertoon, vaan siitä voi muodostua etanolia. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3) Etanolia syntyy aerobisissa olosuhteissa aineenvaihdunnan sivutuotteena aina, kun glukoosi on ainoa hiilenlähde ja kasvatus suoritetaan panostoisesti. Hiivan kulutettua kaiken glukoosin se siirtyy kuluttamaan etanolia uutena hiilenlähteenä. Jos kasvatus suoritetaan jatkuvatoimisesti vakio-tilassa, alhaisilla laimennusnopeuksilla (syötön massavirran suhde fermentorin liuostilavuuteen) hiivan aineenvaihdunta voi olla täysin respiratiivista. (Rieger *et al.*, 1982)

### 3.2.2 Anaerobinen metabolia

Anaerobisessa metaboliassa hiiva käyttää energianlähteenä heksoosisokereita ja oligosakkarideja. (Juvonen *et al.*, 2001) Anaerobisen aineenvaihdunnan aikana *S. cerevisiae* tuottaa etanolia ja hiilidioksidia pääasiassa glukoosista Embden–Meyerhof–Parnas-reitin (EMP-reitti) kautta. EMP-reitistä käytetään myös termiä glykolyysi. (Lin ja Tanaka, 2006) Fermentoinnin aikana *S. cerevisiae* tuottaa etanolin lisäksi sivutuotteina glyserolia, etikkahappoa ja meripihkahappoa. Glyserolia syntyy näistä runsaimmin. (Aldiguer *et al.*, 2004) Glyserolin määrä esimerkiksi viinifermentoinnin lopputuotteessa voi vaihdella välillä 1–15 g/L (Yalcin ja Oxbas, 2008).

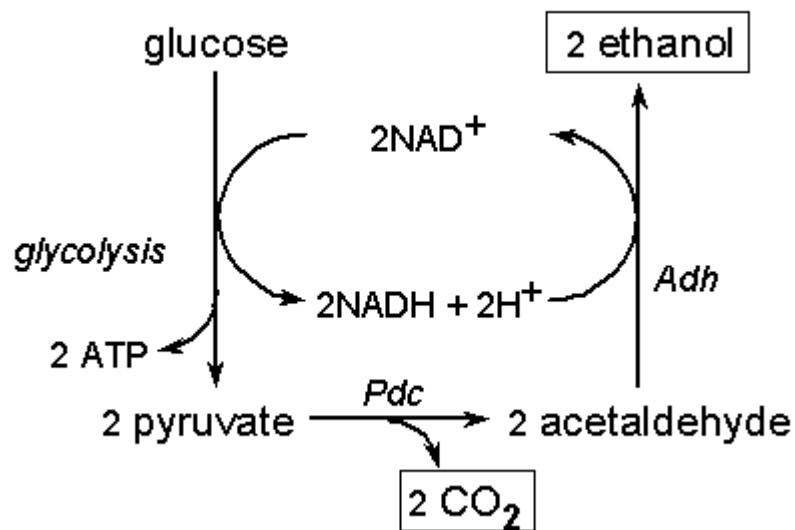
Anaerobisen aineenvaihdunnan black box -stoikiometria on esitetty yhtälössä (3). Hiilenlähteestä eli substraatista, jota yhtälössä kuvaa glukoosi, ja ammoniakista muodostuu hiilidioksidia, etanolia, vettä, biomassaa ja glyserolia. (Nielsen *et al.* 2003, luku 3)

$$-CH_2O - Y_{NS}NH_3 + Y_{CS}CO_2 + Y_{PS}CH_3O_{0,5} + Y_{WS}H_2O + Y_{XS}CH_{1,83}O_{0,56}N_{0,17} + Y_{GS}CH_{2,67}O = 0 \quad (3)$$

Glykolyysin aikana hiiva fosforyloi glukoosin kahdeksi pyruvaattimolekyyliksi käyttäen energianlähteenä ATP:a. Fermentoinnin aikana pyruvaatti hajoaa kahdeksi trioosi-fosfaatti-molekyyliksi. Trioosifosfaatti reagoi edelleen enolipyruvaattihappofosfaatiksi vapauttaen ATP:a siten, että jokaista kulutettua glukoosimolekyyliä kohti muodostuu kaksi ATP-molekyyliä. Anaerobisissa olosuhteissa enolipyruvaattifosfaatista muodostuu lopulta etanolia ja hiilidioksidia. (Hough, 1985, luku 8)

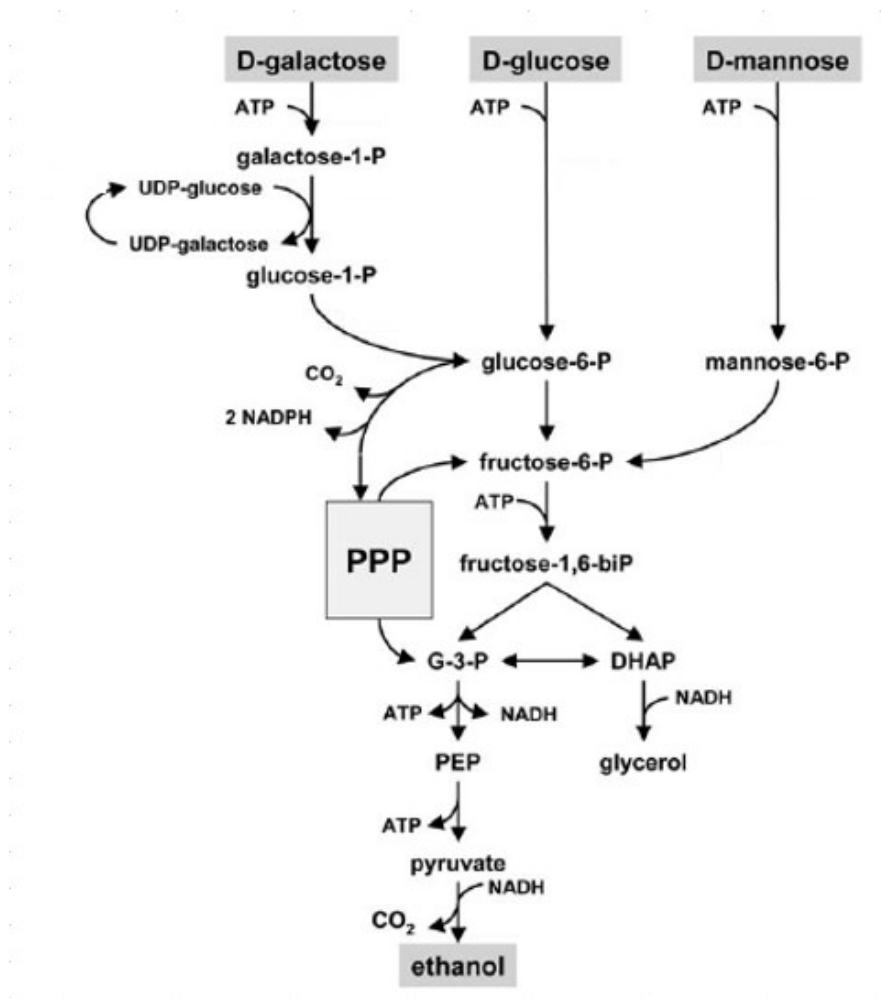
Hiiva ei kuluta kaikkea fermentoinnin aikana vapautunutta ATP:a fermentointiin, vaan ATP-molekyylit toimivat energianlähteenä myös solumassan kasvuun liittyville bio-reaktioille. Jos hiiva ei kuluttaisi fermentoinnista vapautuvaa ylimääräistä ATP:a kasvuunsa, glykolyysi inhiboituisi ATP:n akkumuloitumisen seurauksena. Näin ollen biomassan kasvu on edellytys hiivan glukoosimetabolialle ja etanolintuotannolle. (Bai *et al.*, 2008)

Koska fermentatiivisessa metaboliassa ATP:a syntyy huomattavasti vähemmän kuin respiratiivisessa metaboliassa, biomassan tuotanto fermentatiivisen metabolian aikana on heikompaa verrattuna respiratiiviseen metaboliaan. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Yksinkertaistettu kaavio hiivan fermentatiiviselle metaboliolle on esitetty kuvassa (4). (Flikweert, 1999)



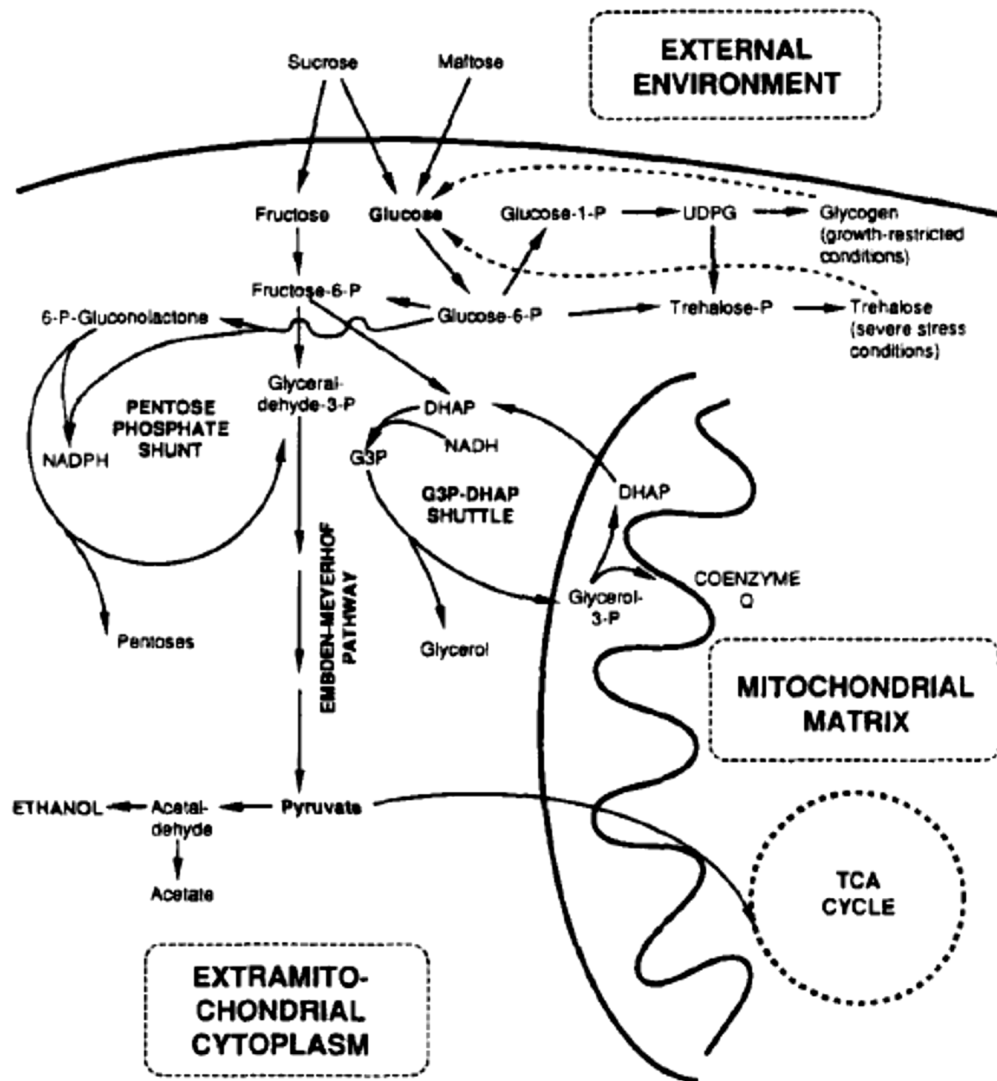
Kuva 4. Hiivan fermentatiivinen metabolia. (Flikweert, 1999)

*S. cerevisiae* metaboloii erilaisia heksoosisokereita anaerobisesti eri välivaiheiden kautta. *S. cerevisiae* kykenee fermentoimaan glukoosin, fruktoosin ja mannoosin D-stereoisomeereja. (Wills, 1990). L-sokereita ja pentooseja *S. cerevisiae* ei kykene fermentoimaan (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8). Glukoosin, fruktoosin ja mannoosin D-isomeerien metaboliareitti etanoliksi *S. cerevisiae* -hiivassa on esitetty kuvassa (5) (van Maris *et al.*, 2006).



Kuva 5. D-galaktoosin, D-glukoosin ja D-mannoosin fermentointireitti *S. cerevisiae* -hiivassa. (van Maris *et al.*, 2006)

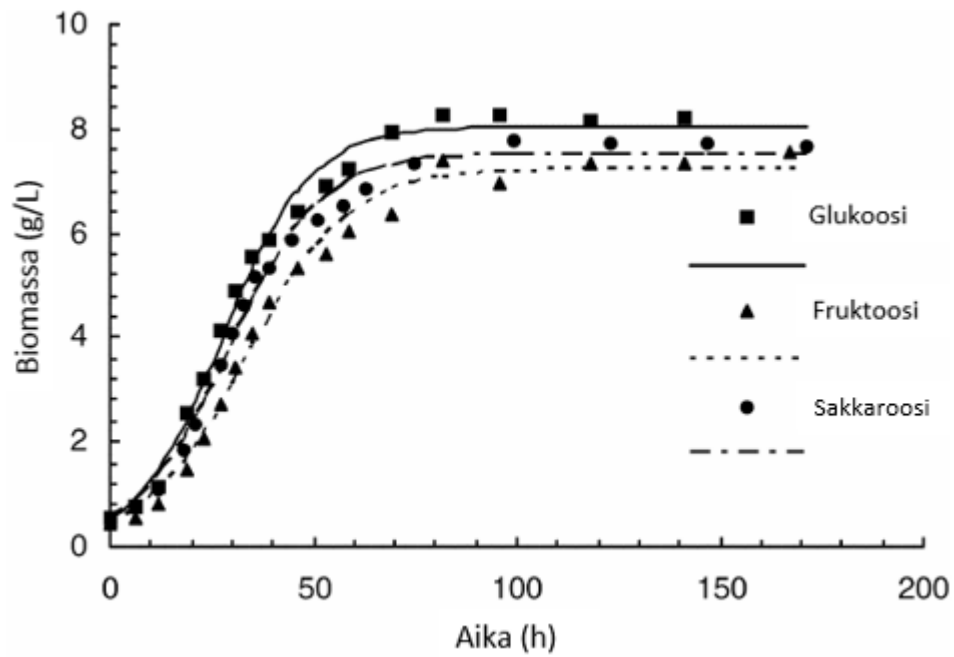
Galaktoosin fermentoimiseksi *S. cerevisiae* vaatii sopeutumisajan, jonka aikana se sopeuttaa metaboliensa soveltuvaksi galaktoosin käsittelyyn. Muita sokereita hiiva kykenee fermentoimaan muuntamalla niitä fermentoituviksi sokereiksi. Sakkaroosin hiiva hajottaa glukoosin ja fruktoosin seokseksi ja maltoosin hiiva hydrolysoi glukoosiksi, kuten kuvassa (6) on esitetty. Kuvasta (6) havaitaan myös, kuinka sokereista Embden–Meyerhof–Parnas-reitillä muodostunut pyruvaatti jakautuu biomassan kasvun (TCA-kierto) ja etanolintuotannon välille. (Wills, 1990)



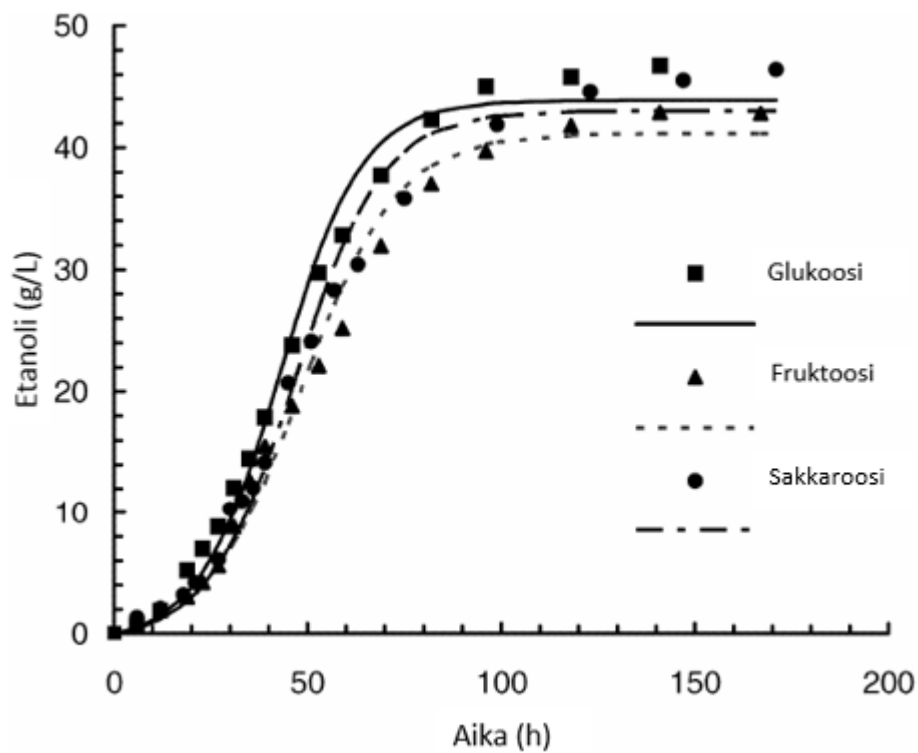
Kuva 6. Sakkaroosin ja maltoosin metaboliareitit ja pyruvaatin jakautuminen etanolin-tuotannon ja biomassan kasvun (TCA-kierto) välille *S. cerevisiae* -hiivassa. (Wills, 1990)

Hiiva kuluttaa glukoosia ja fruktoosia samanaikaisesti, mutta glukoosia hiiva kuluttaa nopeammin kuin fruktoosia. Kannasta riippuen *S. cerevisiae* suosii glukoosia tai fruktoosia energianlähteenä. Useimmat kannat suosivat glukoosia. Sakkaroosia hiiva kuluttaa glukoosia ja fruktoosia hitaammin. Kuten kuvista (7) ja (8) havaitaan, glukoosilla saavutetaan korkeammat biomassa- ja etanolisaannot kuin fruktoosilla ja sakkaroosilla. Sakkaroosilla saavutetaan glukoosia ja fruktoosia matalammat loppukonsentraatiot. (Wang *et al.*, 2004)





Kuva 7. Biomassapitoisuus ajan funktiona, kun fermentoinnin substraatteina ovat glukoosi, fruktoosi ja sakkarooosi. (Wang *et al.*, 2004)



Kuva 8. Etanolipitoisuus, kun fermentoinnin substraatteina ovat glukoosi, fruktoosi ja sakkarooosi. (Wang *et al.*, 2004)

Galaktoosi inhiboi vahvasti glukoosin, fruktoosin ja mannoosin kulutusta. Glukoosi, fruktoosi ja mannoosi inhiboivat hiivan galaktoosin kulutusta heikommin. (Nevado *et al.*, 2004) Maltoosia hiiva kuluttaa glukoosia ja fruktoosia hitaammin. (Hough, 1985)

### **3.2.3 Glukoosin säätelyvaikutus metaboliaan**

Aerobisissa olosuhteissa *S. cerevisiae* metaboliassa esiintyy crabtree-efekti, jota kutsutaan myös Contre–Pasteur-ilmiöksi (Dashko *et al.*, 2014). Crabtree-efekti on glukoosin aiheuttama säätelyilmiö (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8), jonka vaikutuksesta hapen läsnäolosta huolimatta hiiva tuottaa vakio-olosuhteissa respiratiivisen aineenvaihduntansa tuotteena solumassan ja hiilidioksidin lisäksi etanolia. Tällöin etanolia tuottava reitti on täysin aktiivinen, mutta respiratiivinen reitti on osittain repressoitunut. Sokeriliuoksen syöttönopeutta, jolla respiratiivinen aineenvaihdunta pysyy yllä ja jolla hiiva ei tuota etanolia, kutsutaan kriittiseksi laimennusnopeudeksi. Kriittisen laimennusnopeuden yläpuolella *S. cerevisiae* alkaa fermentoida aerobisissa olosuhteissa. (Dashko *et al.*, 2014)

Crabtree-vaikutus voi esiintyä pitkä- tai lyhytaikaisesti. Pitkäaikainen crabtree-vaikutus syntyy, kun hengitystä säätelevät geenit repressoituvat ja hiivan respiratiivinen kapasiteetti rajoittuu. Lyhytaikainen crabtree-vaikutus ilmenee kasvuliuoksessa välittömästi, kun sokeria lisätään liuokseen ylimäärin sokerikonsentraation säätelemässä ympäristössä. (Dashko *et al.*, 2014) Glukoosin läsnäolo kasvuliuoksessa repressoii respiratiivista aineenvaihduntaa ja suosii fermentaatiota jo alhaisissa pitoisuuksissa (1,0 g/L) (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8). Kriittisen laimennusnopeuden arvo riippuu liuenneen hapen konsentraatiosta siten, että mitä matalampi liuenneen hapen konsentraatio on, sitä matalampi kriittinen laimennusnopeus on. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

### **3.2.4 Hapen säätelyvaikutus metaboliaan**

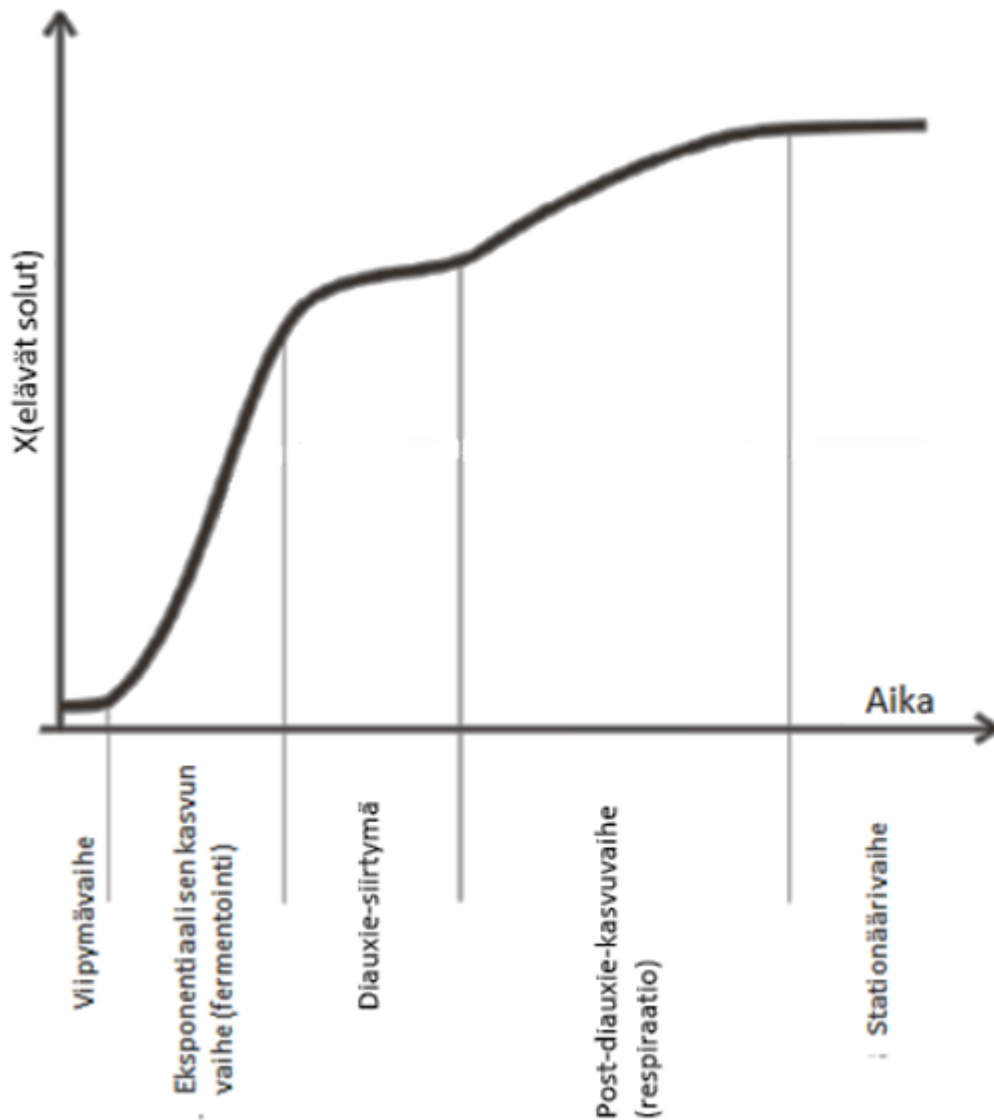
Hiivoilla esiintyvässä Pasteur-ilmiössä hapen määrästä riippuen aineenvaihdunta vaihtelee anaerobisen ja aerobisen välillä. Anaerobisissa olosuhteissa hiiva fermentoi maksimaalisesti. Koska respiratiivinen aineenvaihdunta vapauttaa enemmän energiaa

hiivan käyttöön, aerobisissa olosuhteissa hiiva suosii respiratiivista aineenvaihduntaa. (Madigan *et al.*, 2009, luku 1)

### **3.2.5 Hiilenlähteen vaikutus metaboliaan**

Jos kasvuliuoksessa on läsnä useampi kuin yksi hiilenlähde, jota organismi voi hyödyntää, voi kasvussa esiintyä diauxie-ilmiö. Ilmiössä hiilenlähteistä solulle tehokkaammin hyödynnettävissä oleva lähde käytetään loppuun ennen kuin organismi siirtyy viipymävaiheen kautta metaboloimaan toissijaista lähdettä. Diauxie-siirtymä voi ilmentyä, kun hiivan kasvuympäristössä on saatavilla useita hiivakäymisen substraattiksi soveltuvia sokereita. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Diauxie-siirtymä voi tapahtua myös, kun glukoosi alkaa rajoittaa hiivan kasvua. Tällöin hiivan metabolia muuntuu fermentatiivisesta respiratiiviseksi ja hiiva alkaa käyttää kasvuunsa etanolia ja muita mahdollisia fermentointivaiheessa syntyneitä tuotteita. (Swinnen *et al.*, 2006)

Kun fermentatiivisen metabolian aikana substraatin määrä pienenee, glukoosi alkaa lopulta rajoittaa hiivan metaboliaa. Tällöin hiivan metaboliassa tapahtuu diauxie-siirtymä, jonka aikana metabolia siirtyy fermentatiivisesta tilasta respiratiiviseen tilaan, ja hiiva alkaa käyttää glukoosin sijasta etanolia substraattina. Tämä on esitetty kuvassa (9). Solujen siirtyessä käyttämään ensimmäisen hiilenlähteen jälkeen toista, voidaan käyrällä havaita diauxie-siirtymä. Tällöin vallitsee viipymävaihe, jonka aikana solujen määrä ei merkittävästi kasva ja jonka aikana solut sopeutuvat uuteen hiilenlähteeseen. (Swinnen *et al.*, 2006)



Kuva 9. Diauxie-ilmiö, kun kasvua rajoittava substraatti loppuu. (Swinnen *et al.*, 2006)

### 3.2.6 Ylläpitoilmiö

Mikrobiviljelmien on havaittu kuluttavan enemmän substraattia kuin uuden solumassan syntyminen vaatii. Tämä ylläpitoilmiö on seurausta siitä, että solut kuluttavat substraattia erilaisiin ylläpitäviin toimintoihin. Näitä solua ja kasvustoa ylläpitäviä toimintoja ovat protonigradientin ja elektronisen potentiaalin ylläpito, jotkin solussa tapahtuvat reaktiot, joissa ei synny biomassaa tai metaboliatuotteita, sekä solun rakenneaineiden uudelleensyntetisointi. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 5)

### 3.2.7 Varastohiilihydraattien tuotanto

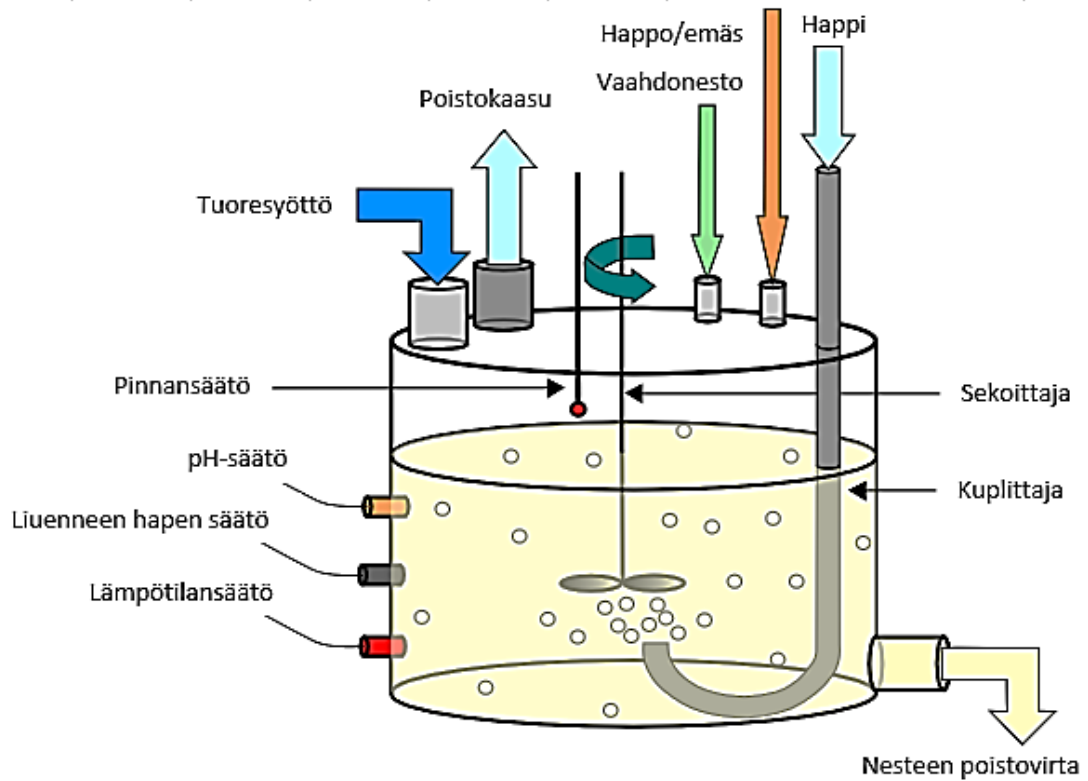
Sopeutuakseen vaihteleviin ympäristöolosuhteisiin hiiva tuottaa kahta varastohiilihydraattia; glykokeenia ja trehaloosia (Sillje *et al.*, 1998). Glykokeeni- ja trehaloosituotannot käynnistyvät, kun hiiltä, typpeä, fosforia (Wilson *et al.*, 2010) tai rikkiä on kasvuympäristössä niukasti (Sillje *et al.*, 1998). Varastohiilihydraatteja syntyy sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa. (Wills, 1990) Varastohiilihydraattien tuotanto voi nälkiintymisen lisäksi käynnistyä osmoottisen stressin tai lämpötilasokin seurauksena. Trehaloosi suojaa hiivaa kuivumista vastaan, ja stabiloi solurakennetta stressitekijöiden vaikuttaessa. Lämpötilasokin aikana trehaloosi ehkäisee proteiinien denaturoitumista ja akkumuloitumista. (Sillje *et al.*, 1998) Esimerkiksi 38 °C on riittävä sokkilämpötila trehaloosituotannon käynnistämiseksi. (Benaroudj *et al.*, 2001) Glykokeenin akkumuloitumiseen johtavat olosuhteet ovat lievemmat kuin trehaloosin akkumuloitumiseen johtavat. Glykokeeni- ja trehaloosituotannon mekanismeja ei tunneta täysin. (Wills, 1990)

Kun ympäristöolosuhteet ovat suotuisat, hiiva voi jakaantumisvaiheen aikana ottaa varastoimaansa trehaloosia ja glykokeenia solun käyttöön hiilenlähteeksi, jolloin glykolyysissä ATP-vuo kasvaa ja solujen jakaantuminen tapahtuu nopeammin kuin ilman trehaloosi- ja glykokeenituotantoa. (Sillje *et al.*, 1998) Glykokeeni ja trehaloosi voivat hajota glukoosiksi, jonka hiivan metabolia käsittelee glykolyttisellä reitillä. (Wills, 1990) Epäsuotuisammissa kasvuolosuhteissa hiiva taas hidastaa kasvuaan ja varastoi hiilihydraatteja varustautuakseen siten selviytymään pitkästäkin aliravitsemusjaksosta (Sillje *et al.*, 1998). Trehaloosia kertyy hiivasoluun myös kasvun stationääri-vaiheen aikana (Benaroudj *et al.*, 2001). Varastointihiilihydraateista tärkeämpi hiivalle on glykokeeni (Wilson *et al.*, 2010).

## 4 Fermentointiprosessin ajotavat

Fermentointi voidaan suorittaa panos-, panossyöttö- tai jatkuvatoimisena prosessina. (Balat, 2011) Yleisesti ajotavasta riippumatta fermentori koostuu säiliöstä, sekoittimesta, syöttö- ja poistoyhteistä, hapen, vaahdonestoaineen, emäksen ja hapon

lisäsyhteistä, sekä pH:n, lämpötilan, liuenneen hapen ja pinnankorkeuden säätimistä. Nämä osat on esitetty kuvassa (10). (Henson, 2006)



Kuva 10. Fermentorin osat. (Henson, 2006)

Kun fermentoriin lisätään jatkuvasti substraattia, kasvuliuosta ja ravinteita tuore-syötössä, ja poistetaan tuotetta jatkuvasti poistovirrassa, kutsutaan fermentointia jatkuvatoimiseksi. Panossyöttöprosessissa fermentoriin voidaan lisätä ajon aikana mikro-organismia ja ravinneliuosta, mutta tuotetta ei poisteta fermentorista ennen ajon päättymistä. Panostoimisessa prosessissa fermentoriin ei ajon aikana syötetä ravinneliuosta tai mikro-organismia, eikä tuotetta poisteta ajon aikana. (Balat, 2011)

Fermentoinnin massatase substraatille voidaan kirjoittaa yleisessä muodossa (4) fermentoinnin ajotavasta riippumatta.

$$\frac{d(SV)}{dt} = -r_s XV + FS^f - F_{ulos}S, \quad (4)$$

missä  $S$  on substraattikonsentraatio,  $X$  on biomassakonsentraatio,  $V$  on fermentoinnin liuostilavuus [L] ja  $F$  on virta sisään fermentoriin [L/h] ja  $F_{ulos}$  on virta ulos fermentorista

ja  $-r_s$  on substraatin kulutusnopeus [ $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]. Yhtälön (4) termit voidaan järjestää uudelleen yhtälön (5) muotoon.

$$\frac{dS}{dt} = -r_s X + \frac{F}{V} S^f - \left( \frac{F_{ulos}}{V} + \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \right) S \quad (5)$$

Missä termi  $\frac{F}{V}$  on laimennusnopeus  $D$  yksikössä [ $\text{h}^{-1}$ ].

Tuotteenmuodostukselle voidaan kirjoittaa fermentorityypistä riippumaton massatase (6), johon on sijoitettu laimennusnopeus. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

$$\frac{dP}{dt} = r_p X + D(P^f - P), \quad (6)$$

missä  $P$  on tuotekonsentraatio,  $P^f$  tuotekonsentraatio syötössä ja  $r_p$  on tuotteenmuodostumisnopeus. Seuraavissa alaluvuissa esitellään ajotavasta riippuvat taseyhtälöt.

#### 4.1 Panosfermentointi

Panosfermentoinnissa fermentoriin lisätään ennen ajon alkua mikro-organismi, ravinneliuos ja fermentoitava hydrolysaatti. Ajon aikana fermentoriin on mahdollista syöttää happoa tai emästä pH:n säätämiseksi, ilmaa (Balat, 2011) ja vaahdonestoainetta (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3). Panosprosessissa hiivan kasvua rajoittaa ravinneliuoksen määrä. (Balat, 2011) Prosessi etenee, kunnes tuotteenmuodostus hidastuu ja lopulta lakkaa substraatin määrän vähentyessä. (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 3) Panosfermentorissa vallitsevat dynaamiset olosuhteet, jolloin kasvuolosuhteet muuttuvat ajan funktiona. Reaktorin säädöllä on mahdollista saavuttaa vakio-olosuhteet esimerkiksi pH:n ja liuenneen hapen suhteen. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

Panostoisissa fermentoinnissa virtaus  $F$  sisään ja ulos reaktorista oletetaan nolllaksi. Tällöin reaktorin kasvatustilavuus  $V$  voidaan olettaa vakioksi, kuten yhtälössä (7) on esitetty.

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (7)$$

Todellisessa fermentointiprosessissa liuoksesta poistuu hiilidioksidiä, jota poistetaan fermentorista jatkuvasti. Näin ollen fermentointitilavuus muuttuisi, ellei fermentaatin tiheyden muutos kompensoisi kaasunpoiston myötä tapahtuvaa muutosta. Käsien laskettaessa käytetään usein vakiotilavuusoletusta.

Panosfermentorin substraattitaseelle voidaan kirjoittaa yhtälö (8).

$$V \frac{dS}{dt} = \left( -\frac{\mu X_1}{Y_{XS}} - mX_1 \right) V, \quad (8)$$

missä spesifinen kasvunopeus  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] voidaan määrittää yhtälöllä (9)

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (9)$$

Biomassataseelle voidaan kirjoittaa yhtälö (10). (Aittomäki *et al.*, 2002, luku 4)

$$V \frac{dX}{dt} = \mu X_1 V \quad (10)$$

Panosfermentorilla laimennusnopeus on nolla, jolloin massatase biomassan ja substraatin suhteen voidaan esittää yhtälöillä (11) ja (12).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (11)$$

Yhtälön (11) reunaehtona on

$$X_{t=0} = X_0.$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s X \quad (12)$$

Yhtälön (12) reunaehtona on

$$S_{t=0} = S_0.$$

Panosfermentoinnin aikana biomassan konsentraatio kasvaa, kunnes substraatin kuluttua loppuun kasvu pysähtyy. Tällöin biomassan kokonaissaanto substraatin suhteen voidaan ilmaista yhtälöllä (13). (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

$$Y_{SX}^{tot} = \frac{X_{loppu} - X_0}{S_0} \quad (13)$$



## 4.2 Panossyöttöfermentointi

Panossyöttöprosessi on yleisin teollisuudessa käytetty fermentointitapa. Prosessissa fermentoriin lisätään ennen ajon alkua mikro-organismi, ravinneliuos ja fermentoitava hydrolysaatti. Ajon aikana fermentoriin voidaan lisätä mikro-organismeja ja ravinneliuosta, mutta tuotetta ei poisteta fermentorista ennen ajon päättymistä. (Balat, 2011) Prosessin yleisimmät ajotavat ovat vakiosubstraattipitoisuus ja vakio volumetrinen biomassan kasvunopeus. Etanolifermentoinnissa yleinen ajotapa on vakiosubstraattipitoisuus, sillä ajotapa vähentää substraatti-inhibition vaikutusta fermentointiin. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3) Panossyöttötekniikka vähentää substraatti-inhibitiota, mutta panosfermentoinnille tyypillinen tuoteinhibitio ja toksiinien akkumulaation aiheuttama inhibitio esiintyvät myös panossyöttöfermentorissa. (Díaz-Montaña, 2013, luku 8)

Panossyöttöjotavan myötä toimintakykyisten solujen maksimikonsentraatio kasvaa, kasvuliuksen elinaika pidentyy ja tuotekonsentraatiota voidaan kasvattaa. Panossyöttöprosessi mahdollistaa myös lämpötilan, pH:n ja muiden kriittisten prosessimuuttujien ylläpidon takaisinkytkentäsäädöllä. (Balat, 2011) Usein panossyöttöprosessin laimennusnopeus on pieni (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3) ja nestetilavuus fermentorissa kasvaa lineaarisesti. (Díaz-Montaña, 2013, luku 8)

Panossyöttöfermentorin syöttövirran ja työskentelytilavuuden muutoksen riippuvuudelle pätee yhtälö (14).

$$F_0 = \frac{dV}{dt} \quad (14)$$

Panossyöttöfermentorissa ei ole poistovirtaa, jolloin  $F_{ulos} = 0$ . (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

Substraattitaseen yhtälö voidaan kirjoittaa myös muodossa (15).

$$\frac{d(VS_1)}{dt} = F_0 S_0 - \left( \frac{\mu X_1}{Y_{XS}} + mX_1 \right) V, \quad (15)$$

missä  $m$  on ylläpitovakio [ $\text{g g}_{\text{solut}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ].

Panossyöttöprosessissa biomassataseelle voidaan kirjoittaa yhtälö (16).

$$\frac{d(VX_1)}{dt} = -F_0X_1 - \mu X_1V \quad (16)$$

Muokkaamalla edellä esitetyt yhtälöt osittaisdifferentiaalimuotoon ja sijoittamalla yhtälöihin  $\frac{dV}{dt} = F_0$ , saadaan substraatti- ja biomassataseiksi yhtälöt (17) ja (18).

(Aittomäki *et al.*, 2002, luku 4)

$$V \frac{dS}{dt} = F_0(S_0 - S_1) + \left( -\frac{\mu X_1}{Y_{XS}} - mX_1 \right) V \quad (17)$$

$$V \frac{dX_1}{dt} = -F_0X_1 + \mu X_1V \quad (18)$$

Sijoittamalla laimennusnopeus substraattitaseen yhtälöön, voidaan substraattitase ilmaista muodossa (19). (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

$$\frac{dS}{dt} = -r_sX + D(S^f - S) \quad (19)$$

### 4.3 Jatkuvatoiminen fermentointi

Jatkuvatoimisessa fermentointiprosessissa mikro-organismi kasvaa sekoitussäiliössä, johon syötetään jatkuvasti ajon aikana substraattia, kasvuliuosta ja ravinteita. Tuotetta poistetaan fermentorista jatkuvasti (Balat, 2011), jolloin työskentelytilavuus fermentorissa on vakio. (Aittomäki *et al.*, 2002) Jatkuvatoimisessa ajotavassa etanolin aiheuttama inhibitio vähenee, kun etanolikonsentraatio pidetään alhaisena. (Días *et al.* 2012) Tuotteena saatavan bioetanolin mukana fermentorista voi poistua soluja ja fermentoitumattomia sokereita. Solut on mahdollista kierrättää prosessiin uudelleenkäytettäviksi. Jatkuvatoimisessa prosessissa on mahdollista saavuttaa noin kolminkertainen tuottavuus panosprosessiin verrattuna. (Balat, 2011) Jatkuvatoimisen prosessin tuottavuus on myös panossyöttöprosessin tuottavuutta korkeampi. (Aittomäki *et al.*, 2002) Jatkuvatoimisen prosessin heikkoutena on kasvanut kontaminaatoriski jatkuvan syötön vuoksi. (Aittomäki *et al.*, 2002)

Jatkuvatoimisessa fermentoinnissa spesifistä kasvunopeutta voidaan säätää syöttöliuoksen laimennusnopeutta muuntamalla. Tällöin biomassakonsentraatiota säätelee

syöttöliuoksen rajoittavan substraatin konsentraatio. Jos jatkuvatoiminen prosessi toimii vakiotilassa, laimennusnopeus on yhtä suuri kuin spesifinen kasvunopeus, mikä on esitetty yhtälössä (20).

$$\frac{F}{V} = D = \mu \quad (20)$$

Edelleen vakiotilassa toimivassa jatkuvatoimisessa prosessissa biomassan konsentraatiolle pätee yhtälö (21). (Aittomäki *et al.*, 2002)

$$X = Y_{XS}(S_0 - S) \quad (21)$$

Jatkuvatoimisessa fermentoinnissa tilavuuden muutos on nolla ja syöttönopeus on yhtä suuri kuin tuotteen virtausnopeus. Jatkuvatoimisen fermentorin tapauksessa substraatille voidaan kirjoittaa yhtälössä (22) esitetty massatase.

$$\frac{dS}{dt} = -r_S X + D(S^f - S) \quad (22)$$

Tuotteenmuodostuksen massatase jatkuvatoimisessa fermentorissa on esitetty yhtälössä (23).

$$\frac{dP}{dt} = r_P X + D(P^f - P) \quad (23)$$

Jos fermentorin syöte ei sisällä tuotekomponenttia, jatkuvatoimisen fermentorin biomassatase voidaan kirjoittaa muotoon (24).

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \quad (24)$$

Kun jatkuvatoiminen reaktori on vakiotilassa, voidaan substraatin kulutusnopeudelle kirjoittaa (25).

$$0 = -r_S X + D(S^f - S) \quad (25)$$

Kun edellä esitettyyn yhtälöön (25) sijoitetaan panosfermentoinnissa johdettu kokonaissaannon yhtälö, saadaan biomassan määrälle yhtälö (26).

$$X = Y_{XS}(S^f - S) \quad (26)$$

Biomassan kasvunopeus jatkuvatoimisessa fermentorissa voidaan määrittää yhtälöllä (27). (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{\max} - D)X \quad (27)$$

#### 4.4 Solujen immobilisointi

Solut voidaan immobilisoida fermentorissa sitomalla ne huokoiseen kantomatriisiin (kasvupohja, soluväliaine) tai kiinnittämällä erilaisille pinnoille. Immobilisoinnin kautta saavutetaan useita positiivisia vaikutuksia, kuten fermentoinnin tuoton kasvaminen, jatkuvan fermentointiprosessin kannattavuuden parantuminen, solujen stabiiliuden kasvaminen, substraatin käytön tehostuminen, sivutuotteiden määrän väheneminen ja käyttökustannusten pieneneminen. (Borovikova *et al.*, 2014) Myös tarvittava reaktori-pinta-ala pienenee. (Bai *et al.*, 2008) Immobilisointi lisää hiivan vastustuskykyä toksiineja vastaan (Borovikova *et al.*, 2014). Lisäksi substraatti- ja tuoteinhibition vaikutukset heikkenevät (Najafpour *et al.*, 2004).

Immobilisoituja soluja voidaan käyttää jatkuvatoimisessa prosessissa, jolloin prosessivirtojen kierrätys mahdollistuu ja jäännössokeri voidaan syöttää uudelleen fermentoriin. Lisäksi immobilisoituja soluja voidaan käyttää useissa peräkkäisissä panosprosesseissa. (Borovikova *et al.*, 2014)

## 5 Fermentoinnin parametrit

Fermentoinnin parametrit voidaan jakaa ympäristön tilaa kuvaaviin ja hiivan toimintakykyä kuvaaviin parametreihin. Ympäristön tilaa kuvaavia parametreja fermentoinnissa ovat lämpötila, pH, etanolikonsentraatio, substraattikonsentraatio ja ravinteiden saatavuus. (Olsson ja Hahn-Hägerdal, 1996) Hiivan toimintakykyä fermentoinnin aikana kuvaavia suoritusparametreja ovat lämpötila-alue, pH-alue, alkoholitoleranssi, kasvunopeus, tuottokyky, osmoottinen sietokyky, spesifisyys, saanto, geneettinen stabiilius ja inhibiittoritoleranssi. (Balat, 2011)

Fermentoinnissa hiivaan vaikuttavat useat stressitekijät, jotka voidaan jakaa ympäristöön ja hiivan metaboliaan liittyviin tekijöihin. Ympäristöön liittyviin stressitekijöihin kuuluvat ravinteiden puute, korkea lämpötila, osmoottinen paine, pH ja kontaminoituminen (Bai *et al.*, 2008), sekä heikot orgaaniset hapot, maitohappo ja etikkahappo (Graves *et al.*, 2007). Metaboliaan liittyvä stressitekijä on etanolin akkumuloituminen systeemiin. (Bai *et al.*, 2008)

Fermentoinnin aikana lämpötila ja pH, joita kutsutaan usein viljelmän parametreiksi, pyritään tavallisesti pitämään vakioina optimaalisissa arvoissa. Muut kuin viljelmän parametrit, kuten sekoitusnopeus ja substraattipitoisuudet, voivat muuttua radikaalisti fermentointiprosessin aikana. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

## 5.1 Lämpötila

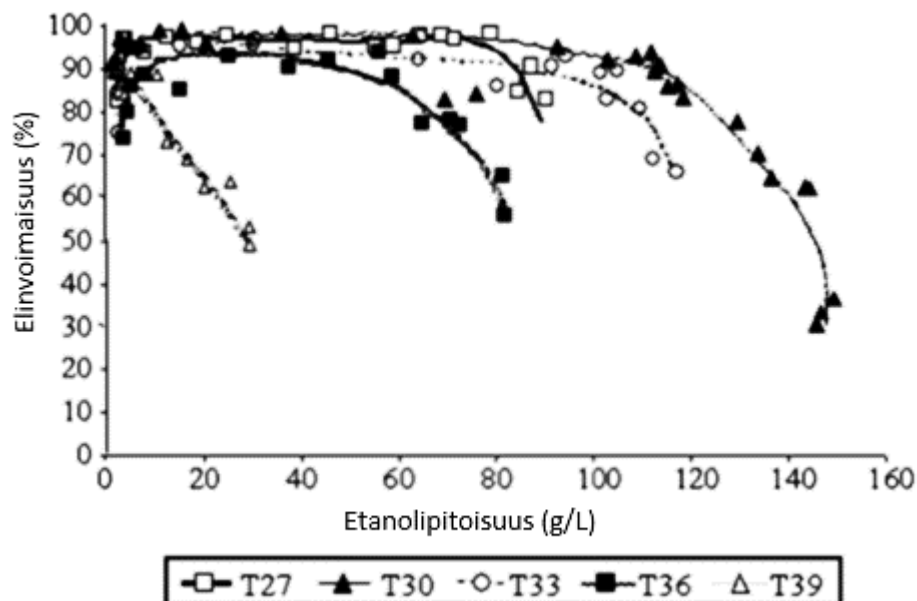
Lämpötila on yksi merkittävimmin *S. cerevisiae* -hiivan metaboliaan, aktiivisuuteen ja elinvoimaisuuteen, sekä edellä mainittujen kautta etanolinsietokykyyn vaikuttavista parametreista. (Amillastre *et al.*, 2012) Lämpötila vaikuttaa solun ylläpitotoimintojen ja kasvuprosessin suhteellisiin reaktionopeuksiin. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Kun fermentointi suoritetaan matalassa lämpötilassa, lämmön aiheuttama inhibitio vähenee. Inhibition vähentyessä substraattikonsentraatiota voidaan kasvattaa, jolloin tuottavuus paranee ja häviöt pienenevät. (Días *et al.* 2012)

Useimmat *Saccharomyces*-suvun hiivat kykenevät kasvamaan lämpötilavälillä 0–40 °C. Maksimaalisen kasvunopeuden ne saavuttavat lämpötilavälillä 28–35 °C. Solusaannon kannalta optimaalinen lämpötila on 26 °C. Optimaalinen fermentointilämpötila-alue on 5–10 °C korkeampi kuin maksimaalisen kasvunopeuden lämpötila. Tehokkainta *S. cerevisiae* -hiivan etanolituotanto on lämpötilavälillä 28–37 °C. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8)

Lämpötila vaikuttaa hiivasolujen elinvoimaisuuteen ja fermentoinnin aikana muodostuvien sivutuotteiden määrään. Aldiguierin *et al.* (2004) panossyöttökokeen mittaustuloksista voidaan havaita, että mittausten alkaessa panossyöttökokeessa 27 °C:ssa ja jatkuessa edelleen 39 °C:een saakka, maksimiarvon solujen elinvoimaisuus

(elävät solut liuostilavuutta kohti) saavuttaa 30 °C:ssa. 39 °C:ssa biomassan määrä laskee huomattavasti.

Etanolituotannon kannalta optimaaliseksi on mittauksissa havaittu lämpötilaväli 30–33 °C. Suoritettaessa mittauksia eri lämpötiloissa, lämpötilan kohotessa 27 °C:sta 39 °C:een solujen elinvoimaisuus laskee. Lisäksi lämpötilan kasvu heikentää hiivan etanolitoleranssia. Nämä seikat voidaan havaita kuvasta (11). (Aldiguieri *et al.*, 2004)

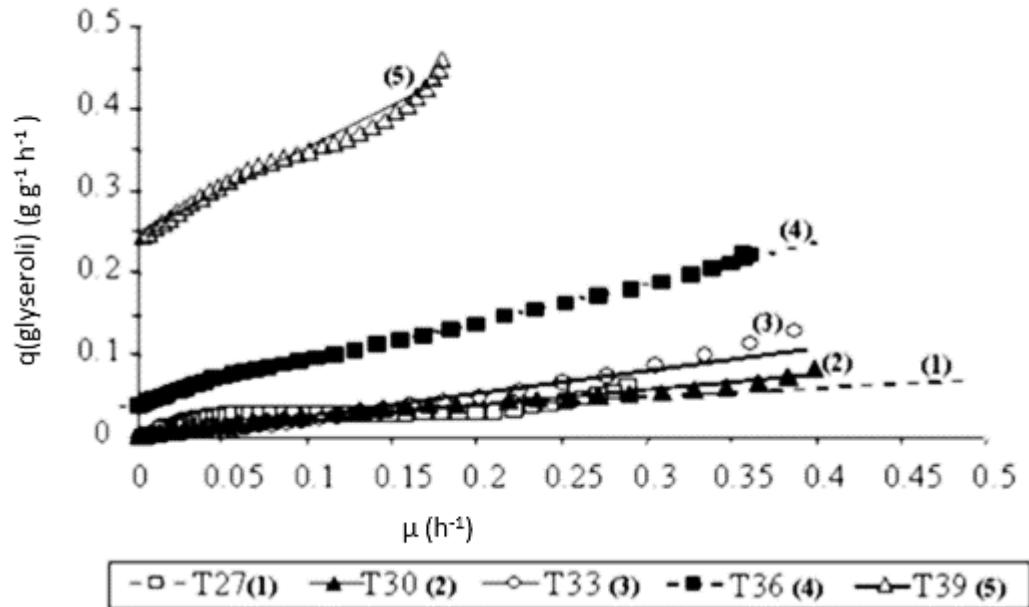


Kuva 11. Solujen elinvoimaisuus etanolipitoisuuden funktiona eri lämpötiloissa panos-syöttökokeessa. (Aldiguier *et al.*, 2004)

Myös rajut siirtymät eri lämpötilojen välillä heikentävät hiivan elinkykyisyyttä. (Amillastre *et al.*, 2012)

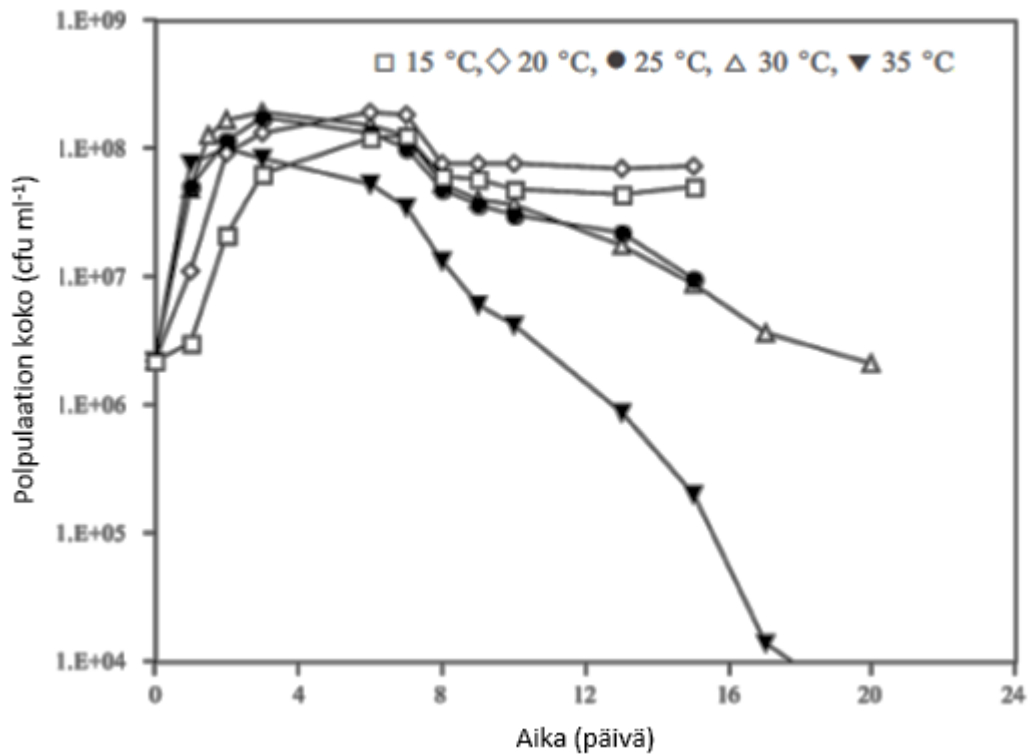
Glyserolin saannon on havaittu Aldiguierin *et al.* (2004) mittausten aikana kasvavan, kun siirrytään 27 °C:sta 39 °C:een. Etikkahapon ja meripihkahapon saantojen on havaittu lämpötilan kasvaessa pienenevän. 39 °C:ssa etanolin, biomassan ja sivutuotteista etikka- ja meripihkahapon saannot ovat mittausten mukaan alhaiset, mutta glyserolin tuotantonopeus kasvaa 39 °C:een siirryttäessä. Kuvasta (12) havaitaan, että biomassan kasvunopeus ja glyserolin tuotantonopeus ovat verrannollisia toisiinsa lämpötiloissa 27, 30 ja 33 °C. Kuvasta havaitaan myös, että glyserolin ja biomassan

tuotto- ja kasvunopeuksien välinen riippuvuussuhde muuttuu 36 ja 39 °C:ssa, kun glyserolin tuotanto jatkuu biomassan kasvun loputtua.



Kuva 12. Glyserolin tuotantonopeus  $q$  spesifisen kasvunopeuden funktiona panos-syöttökokeissa. (Aldiguier *et al.*, 2004)

Torijan *et al.* (2002) mittauksissa on havaittu, että suoritettaessa panosfermentointi 15–20 °C:ssa, fermentointi saavuttaa maksiminopeutensa hitaammin ja maksiminopeus on pienempi kuin fermentoinnilla, joka suoritetaan 25–30 °C:ssa. Maksimipopulaatiot ovat molemmilla lämpötila-alueilla yhtä suuret, mutta korkeammassa lämpötilassa fermentoinnin alkunopeus on suurempi. Korkeammissa lämpötiloissa populaation koko alkaa laskea lopussa, matalammissa lämpötiloissa koko pysyy samana fermentoinnin loppuun saakka. 35 °C:ssa suuri osa *Saccharomyces*-hiivasoluista kuolee fermentoinnin aikana, eikä fermentoituminen jatku loppuun saakka, mikä voidaan havaita kuvasta (13).



Kuva 13. Lämpötilan vaikutus *Saccharomyces*-populaation kokoon panos-fermentoinnissa ajan funktiona. (Torija *et al.*, 2002)

## 5.2 pH

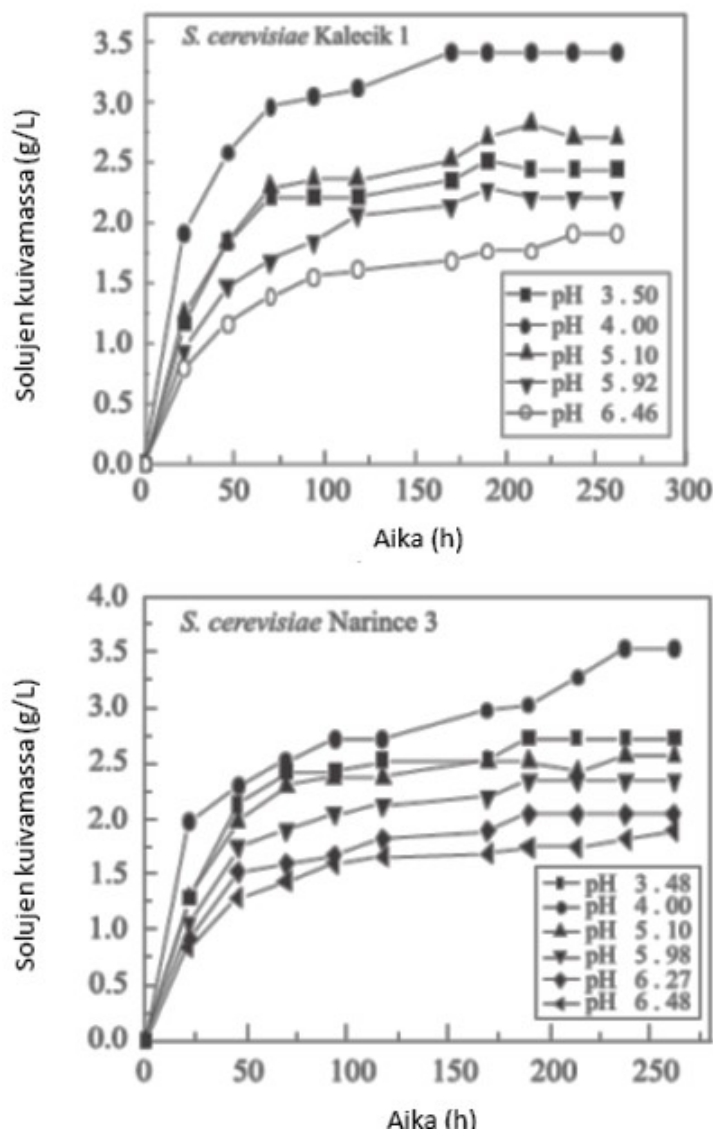
pH:n vaikutus solun aktiivisuuteen riippuu siitä, kuinka herkkiä solun toimintoja säätelevät entsyymit ovat pH-arvon muutoksille. Tavallisesti solun entsyymit voivat toimia rajatulla pH-alueella. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) pH:n ollessa matala, solujen elinkykyisyys heikkenee. Esimerkiksi kasvuliuoksen pH:ssa 4,5 elinkykyisyys voi olla yli 40 %:a korkeampi kuin pH:ssa 3,6. (Dorta *et al.*, 2005)

Alhaisimmaksi solun ulkopuoliseksi pH:ksi, jossa useat *S. cerevisiae* -kannat kykenevät kasvamaan, on mitattu 2,8. Solun sisäinen pH *S. cerevisiae* -hiivalla on 5,5, kun kasvuliuoksen pH on 3,0. Optimaalinen liuoksen pH 30 °C:ssa on 5,0. (Jiménez-Islas *et al.*, 2014) Useimmat *Saccharomyces* kasvatavat liuoksessa pH-alueella 2,4–8,6. Suotuista solunsisäinen pH-alue *S. cerevisiae*lle on 5,8–6,3. Tällä alueella solu kykenee pysyttelemään itsenäisesti, jos ulkoinen pH on alueella 3–7. Ulkoisella pH-alueella 3,5–6 muutokset pH-arvossa fermentoinnin aikana eivät vaikuta solujen kasvuun tai etanolin tuotantoon. Kun kasvuliuoksen pH säädetään välille 4–5, bakteerikontaminaation riski



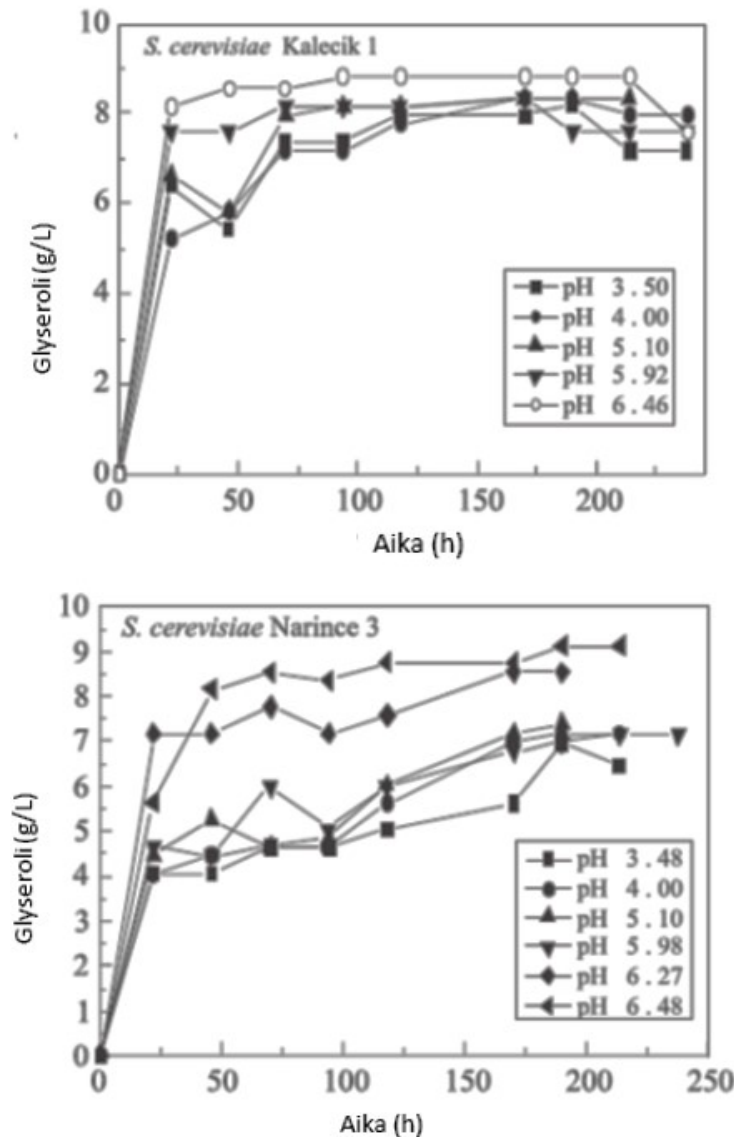
vähenee. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8) Hydrolysaatissa esiintyvät orgaaniset hapot, hiivan tuottama etanoli ja matala ulkoinen pH voivat laskea solunsisäistä pH:ta. (Dorta *et al.*, 2005)

Yalcin ja Oxbas'n panostoimisten mittausten (2008) perusteella Optimaalinen alkupH *S. cerevisiae* kasvulle on 4,0. Tämä voidaan havaita kuvasta (14), jossa biomassakonsentraatio on esitetty ajan funktiona eri alkupH:n arvoilla kahdella *S. cerevisiae* -kannalla.



Kuva 14. Kahden *S. cerevisiae* -kannan biomassakonsentraatio ajan funktiona eri alkupH:n arvoissa ja 30 °C:n vakiolämpötilassa suoritetuissa panosfermentoinneissa. (Yalcin ja Oxbas, 2008)

Yalcin ja Oxbas'n (2008) mittausten perusteella pH-arvo vaikuttaa muodostuvien sivutuotteiden määrään. Kuvasta (15) voidaan havaita, että glyserolin pitoisuus saavuttaa maksimitason korkeammassa pH:ssa kuin biomassan kasvu.



Kuva 15. Glyserolin konsentraatio ajan funktiona panosfermentoinnissa eri pH:n alkuarvoilla ja vakio­lämpötilassa 30 °C kahdella *S. cerevisiae* -kannalla. (Yalcin ja Oxbas, 2008)

Soluissa esiintyy sisäisiä mekanismeja, jotka ylläpitävät solunsisäistä pH:ta ulkoisen pH:n vaihdellessa. Tällöin solun ylläpitotoimintoihin kuluu enemmän energiaa, ja reaktionopeus voi laskea. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Mitä suuremmaksi ero solun sisäisen ja ulkoisen pH:n välillä kasvaa, sitä enemmän ATP:a kuluu solun pH:n yllä-

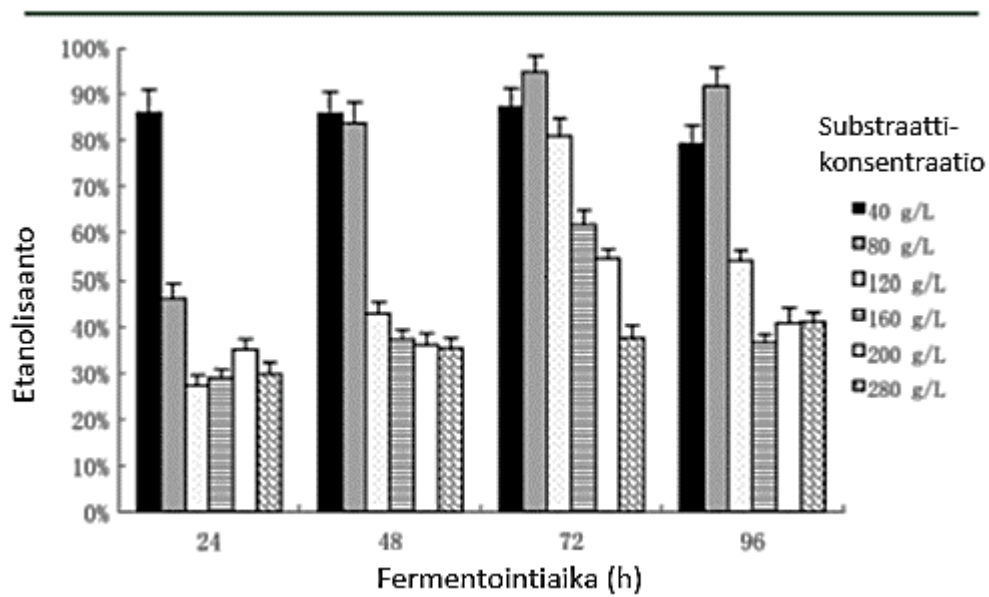
pitoon ja sitä vähemmän ATP:a jää käytettäväksi solumassan kasvuun. (Thomas *et al.*, 2002)

### 5.3 Substraattipitoisuus

Fermentoinnissa substraattina, eli hiivan ravinnonlähteenä, toimii jokin hiilenlähde, joista merkittävin hiivalle on glukoosi. Glukoosi toimii fermentoinnissa paitsi substraattina, myös signaalimolekyylinä, jonka pitoisuuden perusteella hiivasolu optimoi metaboliaansa. Hiiva pyrkii maksimoimaan kasvunsa ja saavuttamaan substraattikonsentraation mukaisen optimitiheyden. Kun glukoosikonsentraatiota kasvatetaan, hiiva lisää kasvua ja kiihdyttää substraatin kulutusnopeutta, kunnes glukoosipitoisuus saavuttaa inhiboivan tason. Myös etanolisaanto kasvaa glukoosipitoisuuden noustessa inhiboivaan pitoisuuteen saakka. (Zhang *et al.*, 2015)

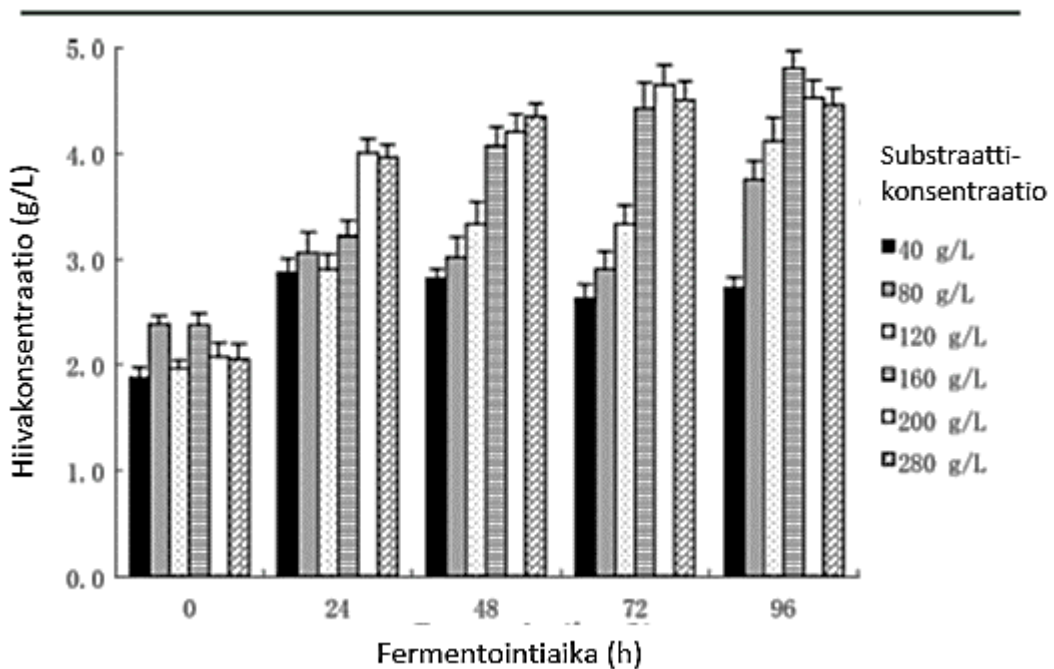
Jos kasvuliuoksessa on panostoisissa fermentoinnissa useampi kuin yksi organismille soveltuva hiilenlähde, organismi suosii lähdettä, jolla sen kasvunopeus on suurempi. Jos jokin toinen substraatti, esimerkiksi typenlähde, alkaa rajoittaa kasvua, organismi siirtyy käyttämään useampia hiilenlähteitä yhtä aikaa. Tällöinkin organismin kasvunopeus on korkeintaan niin suuri, kuin on mahdollista nopeamman kasvun tuottavalla substraatilla yksin. Jatkuvatoimisessa prosessissa organismi kuluttaa useita hiilenlähteitä yhtä aikaa, kun laimennusnopeus on matala. Suurilla laimennusnopeuksilla organismi suosii korkeamman kasvunopeuden takaavaa substraattia. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

Zhang *et al.* (2015) ovat tutkimuksissaan havainneet optimaalisen alkuglukoosikonsentraation olevan etanolisaannon kannalta 80 g/L, kun panosfermentoinnin pH on 5 ja lämpötila 35 °C. Tämä voidaan havaita kuvasta (16).



Kuva 16. Substraatin alkupitoisuuden vaikutus etanolisaantoon panosfermentoinnissa. (Zhang *et al.*, 2015)

Zhangin *et al.* (2015) tutkimuksissa maksimaalinen hiivasolukonsentraatio saavutetaan substraatin alkupitoisuudessa 160 g/L, kuten kuvasta (17) voidaan havaita.



Kuva 17. Substraatin alkupitoisuuden vaikutus solumassan konsentraatioon panosfermentoinnissa. (Zhang *et al.*, 2015)

## 5.4 Ravinteet

Hiivan rakenne koostuu pääasiassa hiilestä, vedystä, hapesta, timestä, rikistä ja fosforista. Nämä ovat ravinteita, joita hiiva vaatii kasvuunsa. (Boer *et al.*, 2003) Lisäksi *S. cerevisiae* kuluttaa elintoiminnoissaan joitakin hivenaineita (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8), sekä magnesiumia, rautaa ja kaliumia (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 2).

Typpeä, joka muodostaa 10 %:a hiivan kuivapainosta, hiiva kykenee sitomaan useista eri lähteistä. Hiivalle soveltuvia typenlähteitä ovat ammoniumasetaatti, -karbonaatti, -bikarbonaatti, -laktaatti, -sulfaatti ja -tartraatti, sekä mono-, di- ja triammoniumfosfaatti. Black box -stoikiometriassa typenlähdetä kuvataan usein ammoniakkinä. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8) Typpi on välttämätön ravinne hiivasolujen kasvun ja jakautumisen kannalta, minkä lisäksi se vaikuttaa etanolin tuotantonopeuteen ja hiivan etanolinsietokykyyn. Lisäämällä kasvuliuokseen vapaata aminotyppeä (free amino nitrogen, FAN) voidaan etanolin loppukonsentraatiota ja solumassan määrää kasvattaa. Kun kasvuliuokseen lisätään liukoista typpeä, glukoosin kulutus kiihtyy ja biomassan saanto kasvaa. (Bafrcová *et al.*, 1999)

Fosfori säätelee hiivan lipidi- ja hiilihydraattisynteesiä ja ylläpitää soluseinämän rakennetta. Fosforia hiiva kykenee käsittelemään esimerkiksi natriumdivetyfosfaattiin sitoutuneena. Rikin *S. cerevisiae* sitoo metioniinista tai ammoniumsulfaatista. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8)

Kasvuliuoksen sisältäessä alimäärän rikkiä, hiiltä tai typpeä, hiiva kykenee sopeuttamaan metabolista järjestelmäänsä siten, että solut kasvavat, mutta aliravitsemuksessa kasvanut solu sisältää keskimääräistä vähemmän kyseisiä komponentteja. (Boer *et al.*, 2003)

Hiivan kasvutekijöihin kuuluu edellä mainittujen lisäksi vitamiineja, aminohappoja, nukleiinihappoja, rasvahappoja ja steroleita. Kun kasvuliuos sisältää kasvutekijöitä valmiina, hiivan ei tarvitse tuottaa niitä itse, ja näin ollen energiaa jää enemmän käytettäväksi biomassan kasvuun ja metaboliatuotteiden tuottamiseen. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8)

## 5.5 Liennut happi

Liunneen hapen määrästä riippuu, missä suhteessa substraattia kulutetaan kasvuun ja fermentointiin. Mitä enemmän liennutta happea kasvuliuksessa esiintyy, sitä suurempi osa hiivan aineenvaihdunnasta on respiratiivista kasvua. Anaerobisissa olosuhteissa, liunneen hapen konsentraation ollessa nolla, aineenvaihdunta on täysin fermentatiivista. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

Täysin anaerobisissa olosuhteissa solu kykenee lisääntymään neljästä viiteen sukupolven ajan. Tämän vuoksi solujen elinvoimaisuuden (elävien solujen määrä näytetilavuudessa) ylläpitämiseksi fermentoinnin aikana on fermentoriin syötettävä happea tai ilmaa. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8) Happea kuluu lipidien synteesiin, joita hiiva käyttää solujen replikointiin, sekä solukalvojen ylläpitoon ja solukalvojen vaurioiden korjaamiseen. Syötettävän hapen määrä on arvioitava tarkoin. Kun happea on ylimäärin, hiivan etanolintuotanto heikkenee kiihtyneen solukasvun myötä. (Gibson *et al.*, 2007) Etanolituotannon heikkeneminen on seurausta siitä, että respiratiivinen aineenvaihdunta tuottaa enemmän energiaa kuin fermentatiivinen. Näin ollen, kun happea on runsaasti liunneena kasvuympäristöön, hiivasolun metabolia suosii aerobista reittiä. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8)

## 5.6 Sivutuotteet

Fermentoinnin sivutuotteena syntyy glykolyttisellä reitillä glyserolia, jota useimmissa fermentoinneissa saadaan noin 1 m/V -%:a fermentointituotteen kokonaismassasta. Glyserolin syntymistä edistävät kasvuliuksen korkea pH, kohonnut osmoottinen paine ja syntyvän pyruvaattivuon pieneneminen glykolyttisten välituotteiden reaktioiden seurauksena. Glyserolin lisäksi sivutuotteina syntyy huomattavasti pienempiä määriä orgaanisia happoja, kuten etikkahappoa ja meripihkahappoa, sekä korkeampia alkoholeja. (Bai *et al.* 2008)

## 5.7 Osmoottinen paine

Osmoottista stressiä esiintyy systeemissä, jos komponentin konsentraatio solun sisällä ja solua ympäröivässä liuoksessa eivät ole tasapainossa keskenään. Osmoottinen stressi voi vallita esimerkiksi, jos ympäristöön liuenneiden aineiden konsentraatio on suuri. Tällöin on kyseessä hyperosmoottinen stressi, johon solu reagoi siirtämällä soluvettä solun ulkopuolelle ja samalla solun nestejännitys pienenee. (Gibson *et al.*, 2007) Esimerkiksi korkea glukoosipitoisuus aiheuttaa hiivasoluille osmoottista stressiä. Kohonnut osmoottinen paine voi lisätä sivutuotteena saatavan glyserolin tuotant nopeutta. (Wang *et al.*, 2013)

## 6 Inhibitio

Fermentointia ja solukasvua inhiboivia komponentteja ovat biomassa, substraatti ja fermentoinnin lopputuotteet (Bai *et al.*, 2008), sekä kontaminantit (Narendranath *et al.*, 2001) ja lignoselluloosahydrolysaatin sisältämät inhibiittoreina toimivat yhdisteet (de Andrade *et al.*, 2013). Fermentointiliuoksessa esiintyvien inhibiittoreiden konsentraation lisäksi inhibition voimakkuus riippuu pH:sta ja lämpötilasta. Näin ollen inhibition vaikutuksia voidaan vähentää säätämällä fermentointiprosessin olosuhteita. (Almeida *et al.*, 2007)

### 6.1 Biomassan aiheuttama inhibitio

Hiivasolumassa voi toimia inhibiittorina, kun biomassan konsentraatio on hyvin korkea. Tällöin biomassa estää ravinteiden pääsyn soluihin. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Näin korkea biomassakonsentraatio on mahdollista saavuttaa immobilisoimalla solut tai kierrättämällä tuoteliuoksesta talteenotettua solumassaa takaisin fermentointivaiheeseen. Kuitenkin merkittävään inhibitioon vaadittavan biomassapitoisuuden saavuttaminen teollisuudessa on käytännössä mahdotonta, minkä vuoksi biomassainhibition huomioiminen kinetiikassa ei ole täyden mittakaavan tuotannon kannalta oleellista. (Bai *et al.*, 2008)

## 6.2 Substraatti-inhibitio

Substraatti-inhibitiota esiintyy systeemissä, kun substraattipitoisuus ylittää lajille ominaisen tason. Mitä korkeampi substraattipitoisuus fermentointiliuoksessa on, sitä todennäköisemmin substraatti-inhibitiota esiintyy ja sitä merkittävämpää inhibitio on. (Bai *et al.*, 2008)

Jos substraatin määrä kasvuliuoksessa saavuttaa tason, jossa ympäristön hiivasoluun kohdistama osmoottinen paine on suurempi kuin solunsisäinen paine, hiivasolun elinvoimaisuus voi heikentyä. Tällöin kasvuliuos on hypertoninen. Hypertonista liuosta alemmissa substraattikonsentraatioissa etanolisaanto kasvaa, kun substraatin konsentraatio kohoaa. Hypertonisella tasolla hiivan kasvunopeuden kohoaminen pysähtyy ja lopulta myös kasvu voi pysähtyä. Hypertonisessa liuoksessa substraatti aiheuttaa hiivan membraaniin vaurioita heikentäen membraanin fluiditeettia eli nestemäisyyttä ja pienentää entsyymiaktiivisuutta. Membraanin fluiditeetin heikentyessä soluun voi akkumuloitua etanolia ja myrkyllisiä metaboliitteja, jotka aiheuttavat häiriöitä solun metaboliaan ja kuljetussysteemeihin. Solu voi myös menettää vettä, mikä johtaa lopulta solun kuivumiseen. (Zhang *et al.*, 2015)

## 6.3 Lopputuoteinhibitio

*S. cerevisiae* voi tuottaa etanolia noin 10–12 til-%:a viidessä päivässä (El-Mansi, E. M. T. *et al.*, 2007), ja voi saavuttaa 18 %:n etanoliväkevyyden. (Lin ja Tanaka, 2006) Etanoli inhiboi sekä solukasvua että etanolisynteesiä. (Bai *et al.*, 2008) Etanolikonsentraatio on pH:n ohella merkittävin solujen elinvoimaisuuteen vaikuttava tekijä. Etanolikonsentraation laskiessa 9,5 %:sta 7,5 %:iin elinvoimaisuus voi kasvaa yli 30 %:a. (Dorta *et al.*, 2005)

Jotkin fermentoinnin sivutuotteet, kuten asetaldehydi ja asetaatti, sekä ympäristölliset stressitekijät, kuten korkea lämpötila, voivat vahvistaa etanolin inhiboivaa vaikutusta. (Bai *et al.* 2008) Lisäksi hyvin matalassa pH:ssa etanolin inhiboiva vaikutus vahvistuu. (Dorta *et al.*, 2005) Etanoli ja pH toimivat solulle stressitekijöinä, joiden myötä hiivasolu voi romahtaa ja vapauttaa solunsisäiset vitamiininsa ja aminohapponsa



ympäröivään liuokseen. Vitamiinit ja aminohapot toimivat ravintoaineina maitohappobakteerille, joka voi esiintyä fermentorissa kontaminanttina. (Dorta *et al.*, 2005)

Etanoli vaikuttaa hiivasolun membraanin lipidirakenteeseen (Dorta *et al.*, 2005) ja solumembraanin potentiaaliin (Bai *et al.* 2008), käynnistää stressiproteiinisynteesin, muuntaa ioninvaihtoprosessia ja pienentää metabolista aktiivisuutta. Näiden vaikutusten myötä hiivan kyky ottaa glukoosia liuoksesta heikkenee, sekä kasvu- ja tuotteenmuodostusnopeudet pienenevät. (Dorta *et al.*, 2005; Ricci *et al.*, 2004) Myös solun muiden ravinteidensaanti voi heikentyä etanolin vaikutuksesta. Pieni määrä happea voi lieventää etanoli-inhibition vaikutuksia, sillä solu käyttää happea rasvahapposynteesissä etanolin aiheuttamien membraanivaurioiden kompensoimiseksi. (Bai, *et al.*, 2008)

Osa etanolin inhiboivasta vaikutuksesta perustuu siihen, että tuotantonopeuden kasvaessa etanolia muodostuu lopulta nopeammin kuin solu kykenee siirtämään sitä ulkopuolelleen. Tällöin etanoli alkaa inhiboida entsyymien toimintaa solun sisällä. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8) Etanoli vaikuttaa solujen morfologiaan, heikentää solujen elinvoimaa ja voi aiheuttaa solukuolemia, mihin hiiva pyrkii reagoimaan. Solu mukauttaa entsyymisysteeminsä toimimaan korkeassa etanolipitoisuudessa viiveellä, eikä solu kykene heti hyödyntämään etanolifermentaation aikana syntynyttä energiaa kasvuunsa. Tämän seurauksena voi systeemissä esiintyä oskillaatioita eli värähtelyjä prosessiparametrien arvoissa, eikä systeemi ole vakio-tilassa. (Bai *et al.*, 2004)

Etanolin lisäksi toinen fermentoinnin lopputuote, hiilidioksidi, voi inhiboida hiivan toimintaa vaikuttamalla hiivan membraanin koostumukseen ja metaboliareitteihin. Hiilidioksidi-inhibitiota voimistavat korkea etanolikonsentraatio ja matala pH. (Tuite ja Oliver, 1991, luku 8)

#### **6.4 Heikot hapot inhibiittoreina**

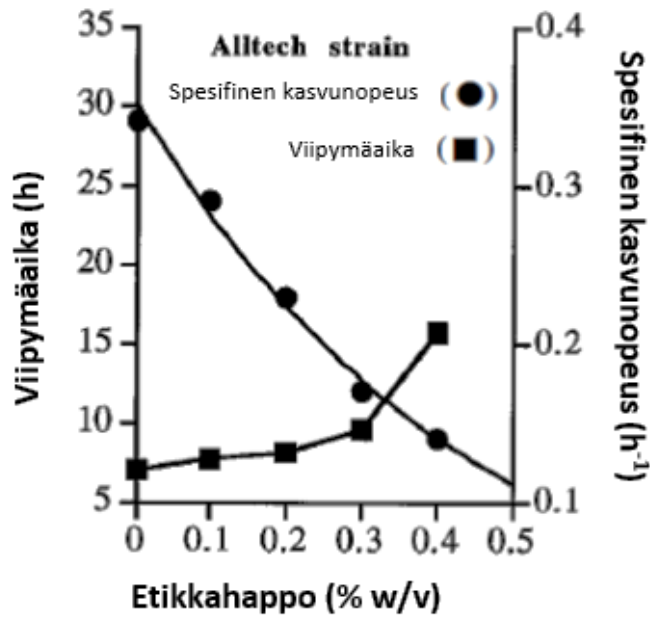
Heikot hapot kuuluvat lignoselluloosahydrolysaatin sisältämiin inhiboiiviin komponentteihin. Näitä heikkoja happoja ovat esimerkiksi maito- ja etikkahappo. Inhiboidakseen fermentointia happojen on saavutettava inhibitorinen pitoisuus. Jos fermentori kontaminoituu maitohappobakteerilla tai etikkahappobakteerilla, näiden

bakteerien tuottamat maitohappo ja etikkahappo voivat saavuttaa inhibitorisen pitoisuuden. (Narendranath *et al.*, 2001)

Liuoksen pH:sta riippuu, kuinka merkittävä inhiboiva vaikutus kasvuliuoksen hapoilla on hiivaan. pH:n arvon ollessa matala, orgaaniset hapot eivät dissosioidu liuokseen, vaan voivat kulkeutua passiivisesti hiivan membraanin läpi solun sisälle. (Dorta *et al.*, 2005) Dissosioitumattomat hapot kykenevät läpäisemään hiivan fosfolipidiosan solumembraanissa, kun liuoksen pH on matalampi kuin solun sisäinen pH. (Narendranath *et al.*, 2001) Solun sisällä orgaaniset hapot dissosioituvat. (Almeida *et al.*, 2007) Solu pyrkii palauttamaan pH-tasonsa pumppaamalla  $H^+$ -ioneja ulos solusta. Pumppaus kuluttaa solun energianlähdettä, ATP:a, jolloin solumassan tuotantoon on käytettävissä vähemmän ATP:a ja biomassan tuotanto laskee. (Narendranath *et al.*, 2001) Happokonsentraation ollessa korkea, solu voi romahtaa pumppauksen seurauksena. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Jotkin hapot, kuten sorbiinihappo, voivat toimia inhibiittoreina myös dissosioituneina. (Narendranath *et al.*, 2001)

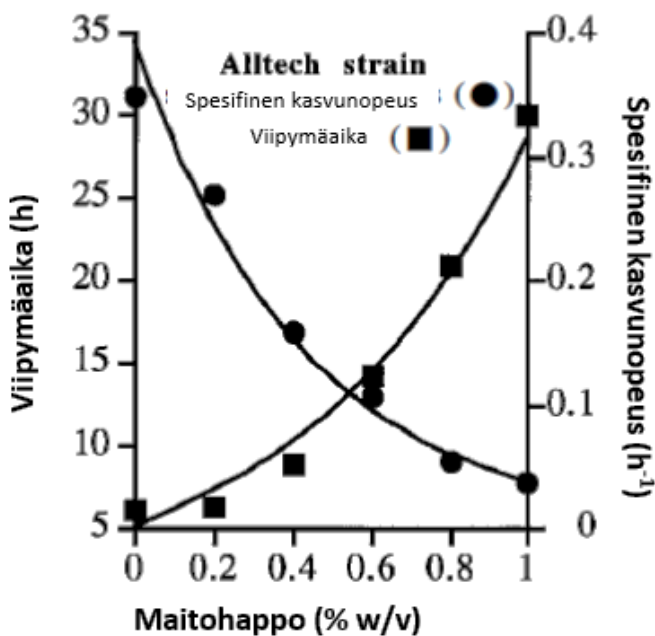
Heikot hapot voivat estää hiivaa ottamasta aminohappoja kasvuliuoksesta. Heikot hapot vähentävät mikrobimassan kasvua ja pienentävät etanolin saantoa. Matalissa konsentraation arvoissa heikot hapot voivat stimuloida ATP:n tuotantoa solussa ja näin ollen lisätä solumassan kasvua. (Almeida *et al.*, 2007) Orgaanisten happojen inhibitorinen vaikutus on voimakkaimmillaan pH-arvon ollessa matala. (Narendranath *et al.*, 2001) Säättämällä kasvuliuoksen pH arvoon 4,5, voidaan happojen aiheuttamaa inhibitiota huomattavasti alentaa. (Thomas *et al.*, 2002)

Narendranathin *et al.* (2001) mittauksissa havaittu etikkahappopitoisuuden vaikutus spesifiseen kasvunopeuteen ja kasvun viipymävaiheen kestoon on esitetty kuvassa (18).



Kuva 18. Etikkahappopitoisuuden vaikutus spesifiseen kasvunopeuteen ja kasvun viipymävaiheen kestoon *S. cerevisiae*n kasvatuksessa. (Narendranath et al., 2001)

Maitohappopitoisuuden vaikutus spesifiseen kasvunopeuteen ja kasvun viipymävaiheen kestoon on esitetty kuvassa (19). (Narendranath et al., 2001)



Kuva 19. Maitohappopitoisuuden vaikutus spesifiseen kasvunopeuteen ja kasvun viipymävaiheen kestoon *S. cerevisiae*n kasvatuksessa. (Narendranath et al., 2001)

Maitohappobakteerit metaboloivat hiilihydraattia muodostaen maitohappoa ja etikkahappoa (Graves *et al.*, 2006). Maitohappobakteeri kilpailee hiivan kanssa ravinteista (Narendranath *et al.*, 2001). Jos maitohappobakteeria esiintyy fermentorissa merkittävästi, sen tuottamat metaboliatuotteet voivat inhiboida *S. cerevisiae*n toimintaa. (Graves *et al.*, 2006)

Maitohappo kykenee pysäyttämään koko sokerin kulutuksen ja etanolituotannon jo suhteellisen alhaisissa pitoisuuksissa. Maitohapon ja etikkahapon yhteisvaikutus systeemissä on huomattavasti korkeampi kuin happojen vaikutus yksinään. (Narendranath *et al.*, 2001)

Rikkihappoa voidaan käyttää ehkäisemään kasvuliuoksen kontaminaatiota. Rikki voi esiintyä kasvuliuoksessa eri tavoin sitoutuneena liuoksen pH-arvosta riippuen. Myös rikki voi toimia inhibiittorina hiivalle, jos sitä on liuoksessa ylimäärin.  $\text{SO}_2$ - ja  $\text{HSO}_3^-$  -muodot ovat hiivalle myrkyllisempiä kuin  $\text{SO}_3^{2-}$  -muoto. Myrkyllisemmät muodot esiintyvät pH-alueella 1,0...4,5 ja vaarattomampi muoto alueella 5,0...7,0. (Dorta *et al.*, 2005) Rikkihappo vahingoittaa kontaminanttibakteereja, mutta vaikuttaa verrattain heikosti hiivasoluihin. (Amorim *et al.*, 2011)

## 6.5 Furaanijohdannaiset ja fenolit inhibiittoreina

Heikkojen happojen lisäksi lignoselluloosahydrolysaatin sisältämiin inhibiittoreihin kuuluu furaanijohdannaisia ja fenoleja. Furaanijohdannaisten aiheuttaman inhibition vaikutuksesta etanolin tuotantonopeus laskee ja mikro-organismin kasvu inhiboituu tai kasvun viipymävaihe pitenee. Etanolisaantoon furaaneilla ei ole merkittävää vaikutusta. Furaanijohdannaisten inhiboiva vaikutus perustuu useisiin tekijöihin. Ne esimerkiksi inhiboivat suoraan eri metaboliareiteillä toimivia entsyymejä. *S. cerevisiae* -hiivan tapauksessa furfuraali vahingoittaa mitokondriaalisia membraaneja, kromatiinia ja aktiineja. Tällöin hiivan energiaa kuluu vaurioiden paikkaamiseen ja vähemmän energiaa jää metabolian toimintaan. (Almeida *et al.*, 2007)

Fenolien vaikutuksesta etanolin tuotantonopeus laskee, mutta fenoleilla ei ole merkittävää vaikutusta etanolisaantoon. (Klinke *et al.*, 2004) Fenoliyhdisteiden

inhibitiomekanismit vaihtelevat yhdisteestä riippuen, eivätkä mekanismit ole tällä hetkellä täysin tunnettuja. (Almeida *et al.*, 2007)

Hiiva kykenee muuttamaan joitakin inhibiittoreita vähemmän haitallisiksi yhdisteiksi eli detoksifioimaan niitä. HMF:n *S. cerevisiae* kykenee pelkistämään 2,5-bis-hydroksimetyyllifuraaniksi. Furfuraalin hiiva voi pelkistää furfuryylialkoholiksi tai hapettaa muurahaishapoksi. Pelkistuksen ja hapetuksen myötä etanolin tuotanto ja mikrobimassan kasvu palautuvat, mutta nopeudet ovat matalammat kuin ennen inhibitiota. Osan hydrolysaatissa esiintyvistä fenolisista yhdisteistä *S. cerevisiae* voi hyödyntää luontaisesti aineenvaihdunnassaan. (Almeida *et al.*, 2007)

Kun solutiheys fermentorissa on korkea, detoksifikaatio tapahtuu suuremmalla volumetrisella nopeudella ja fermentointi tehostuu. Etanolin tuotanto voidaan maksimoida, kun hydrolysaattisyöttö säädetään samalle tasolle hiivan detoksifikaatiokapasiteetin kanssa. Jos fermentorin syöttönopeus säädetään siten, ettei hiivan inhibiittoreiden hapetuskapasiteetti ylitä, fermentointi ei katkea. Hydrolysaatti kuitenkin sisältää yhdisteitä, kuten heikkoja happoja, joita hiivan metabolia ei kykene käsittelemään, ja jotka näin ollen akkumuloituvat fermentoriin. Nämä akkumuloituvat inhibiittorit voivat lopulta pysäyttää fermentointiprosessin. (Almeida *et al.*, 2007)

## 7 Fermentoinnin kineettiset mallit

Kineettiset mallit kuvaavat yhteyttä substraatin S kulutusnopeuden  $-r_s$ , biomassan X muodostumisnopeuden  $r_x$  ja tuotteen P muodostumisnopeuden  $r_p$  välillä. Mallinnuksen tavoitteena on valita mahdollisimman yksinkertainen, mutta silti todellisuuden käyttäytymistä täsmällisesti kuvaava ja ennustuskykyinen malli, joka sisältää kaikki ilmiöt, jotka vaaditaan tarkasteltavan prosessin kuvaamiseksi. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Fermentoinnin kinetiikkaa kuvaavat mallit koostuvat kolmesta osasta; substraatin kulutusmallista, biomassan kasvumallista ja tuotteen muodostumis- mallista. (El-Mansi *et al.*, 2007) Edellä mainitut nopeuslausekkeet on esitetty yhtälöissä (28...30). (de Andrade *et al.*, 2009)

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (28)$$

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad (29)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (30)$$

Kineettiset mallit kuvaavat riippuvuutta substraatin, metaboliatuotteiden, biomassan rakenneaineiden, solunsisäisten metaboliittien ja biomassan konsentraatioiden ja reaktionopeuksien välillä siten, että massataseeseen yhdistettynä niiden avulla voidaan ennustaa substraattien konversiota ja tuotteiden saantoa myös muissa opeointiolosuhteissa, kuin niissä, joissa ne on kehitetty. (El-Mansi *et al.*, 2007)

Kineettisiä malleja voidaan luokitella eri tavoin. Mallit voidaan jakaa empiirisiin ja mekanistisiin malleihin. Empiiriset mallit perustuvat empiiriseen tutkimukseen ja parametrit ovat sovitettuja. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3) Empiirisissä malleissa kaikilla parametreilla ei ole fyysistä merkitystä. (Liu ja Li, 2014) Mekanistinen malli perustuu oletukseen reaktiomekanismista. Mekanistisia malleja käytetään, kun tarkoituksena on tarkastella prosessin taustalla olevaa mekanismia. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

Toinen kahtiajako voidaan tehdä strukturoituihin ja strukturoimattomiin malleihin. Strukturoiduissa malleissa mikrobikasvusto oletetaan monikomponenttisysteemiksi,

strukturoimattomissa malleissa systeemin ajatellaan koostuvan vain yhdestä komponentista. (Bailey ja Ollis, 1986. Luku 7)

Kolmannen jaon perusteella mallit voidaan luokitella jakautuneisiin (segregated) ja ei-jakautuneisiin (non-segregated) malleihin. Jakautuneissa malleissa solut kuvataan diskreetteinä ja heterogeenisinä. Ei-jakautuneissa malleissa solujen ominaisuudet lasketaan koko populaation solujen ominaisuuksien keskiarvona. Todellisessa tilanteessa systeemi on segregoitu ja strukturoitu, jolloin systeemi koostuu useista eri komponenteista ja jokainen solu on erilainen. (Bailey ja Ollis, 1986. Luku 7)

Neljänneksi mallit voidaan jakaa stokastisiin ja deterministisiin malleihin. Stokastiset mallit perustuvat tiheysjakaumiin, joissa biologisten prosessien tulokset voivat esiintyä määrättyllä alueella. Deterministisissä malleissa biologisten prosessien tulokset ovat diskreettejä ja populaation ominaisuuksia käsitellään keskiarvona. Vaikka reaali-maailmassa biologiset systeemit käyttäytyvät stokastisesti, malleissa tilannetta normaalisti yksinkertaistetaan. (Gormely, 1968)

## **7.1 Spesifiset nopeudet ja saantokertoimet**

Kineettisen mallin muodostamiseksi on tunnettava prosessissa esiintyvien kemiallisten reaktioiden stoikiometria, reaktionopeudet ja saantokertoimet. On tunnettava sekä substraatin että metaboliatuotteiden ja biomassan rakenneaineiden rakennekaavat. Kun solu tuottaa biomassaa ja metaboliatuotteita, tapahtuu solussa useita biokemiallisia reaktioita, joita katalysoivat useat entsyymit. Fermentointiprosessin mallinnuksen kannalta yksittäisten reaktioiden tai entsyymikinetiikan mallinnus ei ole tarpeenmukaista, kun tarkoituksena on kuvata solumassan kasvua ja halutun loppu-tuotteen muodostumista, eikä kuvata yksittäisen reaktion merkitystä kokonaisreaktioreitillä.

Spesifinen kasvunopeus  $\mu$  on solujen kasvua biomassayksikköä kohti kuvaava suure, joka voidaan ilmaista luvussa 4.1. esitetyllä yhtälöllä (9).

Spesifinen tuotteenmuodostusnopeus kuvaa etanolin muodostusta biomassayksikköä kohti ja se voidaan ilmaista yhtälöllä (31).

$$q = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (31)$$

Tuotteen kokonaissaanto, joka ilmaisee, kuinka suuri osa glukoosin hiilestä päätyy haluttuun lopputuotteeseen, voidaan esittää saantokertoimilla. Saantokerroin kuvaa tarkastellun komponentin muodostumisnopeutta suhteessa valittuun referenssi-komponenttiin. Kun substraatti toimii referenssiyhdisteenä, saantokertoimet voidaan kirjoittaa yhtälöissä (32...33) ilmaistuihin muotoihin. (El-Mansi, E. M. T. *et al.*, 2007, luku 3)

$$Y_{PS} = \frac{r_P}{r_S} \quad (32)$$

$$Y_{XS} = \frac{\mu}{r_S} \quad (33)$$

Saantokertoimien avulla voidaan ilmaista substraatin kulutusnopeus, kuten yhtälössä (34) on esitetty. (Birol *et al.*, 1998)

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{XS}} \frac{dX}{dt}\right) - \left(\frac{1}{Y_{PS}} \frac{dP}{dt}\right) \quad (34)$$

## 7.2 Solukasvun black box -malli

Solukasvun stoikiometriaa voidaan kuvata yksinkertaistetusti black box -mallilla (the black box model), jossa kaikki solussa tapahtuvat reaktiot yhdistetään yhdeksi kokonaisreaktioksi. Kokonaisreaktion stoikiometrisina kertoimina toimivat komponenttien saantokertoimet biomassan suhteen. Yhdistetty kokonaisreaktiolauseke voidaan esittää yhtälöllä (35).

$$X + \sum_{i=1}^M Y_{XP_i} P_i - \sum_{i=1}^N Y_{XS_i} S_i = 0 \quad (35)$$

Black box -mallissa saantokertoimet oletetaan vakioiksi, vaikka todellisessa systeemissä ne eivät ole vakioita. Mallilla voidaan kuitenkin esimerkiksi arvioida koedatan johdonmukaisuutta. Edellä esitetty tasapainoyhtälö voidaan kirjoittaa kaikille



systemeissä esiintyville konversioon osallistuville alkuaineille, eli hiilelle, vedylle, hapelle ja typelle. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

### 7.3 Eksponentiaalisen kasvun laki

Eksponentiaalisen kasvun laki on yksi ensimmäisistä ja yksinkertaisimmista mikrobi-populaation kasvua kuvaavista malleista. Malli sopii ainoastaan symmetrisesti jakaantuville organismeille. Hiivat jakaantuvat asymmetrisesti, mutta suorat mittaukset ovat osoittaneet, että eksponentiaalista kasvua ilmenee kaikilla eukaryooteilla, joihin myös hiivat kuuluvat.

Eksponentiaalisen kasvun laki voidaan johtaa yhtälöstä (36), joka kuvaa mikrobimassan kasvua aikayksikköä kohden.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (36)$$

Jos verrannollisuusvakiona toimivan spesifisen kasvunopeuden oletetaan pysyvän vakiona, yhtälö (36) voidaan integroida yhtälön (37) esittämään muotoon. (Panikov, 2010)

$$X = X_0 \exp(\mu t) \quad (37)$$

### 7.4 Strukturoimattomat kineettiset mallit

Strukturoimattomia kineettisillä malleilla voidaan ennustaa spesifistä kasvunopeutta, kun reaktion oletetaan noudattavan black box -stoikiometriaa ja itsenäisiä muuttujia on yksi tai muutama. Tällöin tärkeimmillä riippumattomilla muuttujilla (key-independent variables) voidaan stoikiometrinen kerrointen avulla määrittää kaikkien muiden substraattien ja tuotteiden kulutus- ja muodostumisnopeudet. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

Strukturoimatonta mallia tuotteen muodostukselle voidaan soveltaa, kun tuotteen muodostumisen ja substraatin kulutuksen tai solukasvun välillä vallitsee yksinkertainen stoikiometrinen riippuvuus, eli tuotteenmuodostuminen on kasvuun liittyvää. Tämä

pätee esimerkiksi etanolifermentoinnissa. Edellä kuvattu yksinkertainen stoikiometrinen riippuvuus on ilmaistu yhtälöissä (38) ja (39). (Bailey ja Ollis, 1986, Luku 7)

$$r_P = -Y_{PS}r_S \quad (38)$$

$$r_P = Y_{PX}r_X \quad (39)$$

Jos kasvu on tasapainossa (balanced growth), kasvukinetiikan määrittelyyn vaaditaan vain spesifinen kasvunopeus tai populaation kaksinkertaistumisaika. Tämä pätee esimerkiksi CSTR-reaktorissa vakiotilassa tapahtuvan eksponentiaalisen kasvun aikana. (Bailey ja Ollis, 1986. Luku 7) Tasapainossa oleva kasvu tarkoittaa, että biomassan rakenne on vakio kasvatuksen aikana. Tällöin solun sisäisten reaktioiden nopeuksien on oltava verrannollisia toisiinsa. Kun kasvu on tasapainossa, kasvua voidaan kuvata yhdellä muuttujalla, joka kuvaa biomassan tilaa. Strukturoimattomien mallien ainoana kasvua kuvaavana muuttujana toimii biomassan konsentraatio. Spesifinen kasvunopeus on strukturoimattomissa malleissa vakio. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

Strukturoimattomissa malleissa oletetaan, että muutos rajoittavan substraatin konsentraatiossa aiheuttaa välittömän vasteen reaktionopeudessa. Vastoin tätä oletusta, mikrobikasvu on laaja, useiden biokemiallisten reaktioiden muodostama kokonaisuus, joten biomassan rakenne reagoi substraattipitoisuuden muutoksiin viiveellä. Näin ollen strukturoimattomat kineettiset mallit aliarvioivat dynaamisten muutosten aikavakioita. (Nielsen *et al.* 2003, luku 7)

Strukturoimattomat mallit eivät huomioi ympäristön olosuhdemuutosten aiheuttamaa vaihtelua solujen biokemiallisessa rakenteessa tai entsyymaattisessa aktiivisuudessa (Panikov, 2010), ja kasvu oletetaan näissä malleissa riippumattomaksi biomassan koostumuksesta. Kuitenkin viipymävaiheen aikana biomassan koostumuksessa tapahtuu muutoksia ja spesifinen kasvunopeus kasvaa ajan funktiona. Tämän vuoksi edellä mainituilla malleilla ei voida kuvata viipymävaiheen aikana tapahtuvaa kasvua. Esimerkiksi diauxic growth -tapauksia, joissa fermentoinnissa esiintyy useita viipymävaiheita, ei voida perinteisillä strukturoimattomilla malleilla kuvata. (Nielsen *et al.* 2003, luku 7)

Strukturoimattomat mallit soveltuvat vakiovirtaus- tai panosprosessien suunnitteluun ja yksinkertaisten suunnitteluongelmien ratkaisuun. Strukturoimattomien mallien ennustavuus on heikko. (El-Mansi *et al.*, 2007)

## 7.5 Monodin malli

Strukturoimattomiin malleihin kuuluva Monodin malli perustuu empiiriselle havainnolle, jonka mukaan vakiovirtaustilassa pienillä substraattipitoisuuksilla, substraattipitoisuuden lähestyessä nollaa, spesifinen biomassan kasvunopeus on lineaarisesti verrannollinen glukoosin konsentraatioon. Suurilla substraattipitoisuuksilla spesifinen kasvunopeus on riippumaton substraatin konsentraatiosta. Tällöin bioreaktion nopeusyhtälö on ensimmäistä kertaluokkaa substraattipitoisuuden suhteen.

Substraattipitoisuuden lähestyessä nollaa nopeus muuttuu lopulta vakioksi, sillä koko solun metabolinen järjestelmä keskittyy tuottamaan substraatista biomassaa. Metaboliatuotteen muodostuminen vähentää biomassan muodostusta, ja korkea substraattikonsentraatio pienentää biomassan muodostumisnopeutta. Koska mallissa biomassan konsentraatio on ainoa biomassaa kuvaava termi, biomassan konsentraatio on oletettava vakioksi prosessin aikana. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Mikrobin kasvulle välttämätön substraatti toimii siis reaktion rajoittavana tekijänä (Han ja Levenspiel, 1987) ja inhibitiota ei esiinny. (Birol *et al.*, 1998).

Monodin mallin mukainen kasvukäyrä on hyperbolinen. (Gomes ja Menawat, 1992) Yhtälöissä (40) ja (41) ovat Monodin mallin mukainen spesifinen biomassan muodostumisnopeus ja spesifinen tuotteen muodostumisnopeus. (Kostov *et al.*, 2012)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{SX} + S} \quad (40)$$

$$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S} \quad (41)$$

Monodin mallin perusmuodossa oletetaan, että bioreaktori on hyvin sekoittunut, ja että reaktorissa ei esiinny gradientteja. Lisäksi oletetaan kaikkien hiivasolujen olevan elossa, eikä niiden mahdollista kuolemaa fermentoinnin aikana oteta huomioon.

Oletetaan myös, että sekoitus on riittävä siten, että substraatin saatavuus kaikkialla reaktorissa on yhtä suuri. (Dodic *et al.*, 2012)

Jos kasvuliuksessa on läsnä useampi kuin yksi rajoittava substraatti, voidaan Monodin yhtälöä modifioida muotoon (42). (Bailey ja Ollis, 1986. Luku)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_1}{K_1 + S_1} \frac{S_2}{K_2 + S_2} \dots \quad (42)$$

Monodin malli ei kuvaa viipymävaiheita, substraattien vaiheittaista hyödyntämistä tai solujen koon vaihtelua panosprosessin aikana. Malli ei siis huomioi solujen vastetta ympäristön olosuhteiden muutoksiin. (Fredrickson, 1976) Monodin malli soveltuu kuvaamaan panosprosessia, jossa esiintyy yksi eksponentiaalinen vaihe, sekä jatkuva-toimista fermentointia vakio-tilassa. (El-Mansi *et al.*, 2007, luku 3)

Koska Monodin mallista puuttuu mekanistinen perusta, malli ei ole ideaalinen suuren mittakaavan tuotantoprosessien scale-up:iin ja optimointiin. (Liu ja Li, 2014)

## 7.6 Monodin mallin johdannaiset

Monodin malli toimii perustana lähes kaikille nykyisin käytössä oleville fermentoinnin kineettisille malleille. Monodin mallista muodostetuissa johdannaisissa otetaan huomioon erilaisia kinetiikkaan vaikuttavia tekijöitä, kuten ylläpitoilmiö, erilaiset inhibitoilmiöt ja epäaktiivisten solujen vaikutus. (Liu ja Li, 2014)

### 7.6.1 Ylläpitoilmiö

Monodin mallissa biomassan saanto substraatin suhteen oletetaan vakioksi ja kaikki solussa tapahtuvat reaktiot yhdistetään kokonaisreaktioksi prosessille, jossa substraattista muodostuu biomassaa. On kuitenkin osoitettu, ettei biomassan saanto substraatin suhteen ole vakio, vaan organismi kuluttaa biomassaa solun ylläpitoon. (El-Mansi *et al.*, 2007)

Kun kineettisessä mallissa huomioidaan, että osa substraatista kulutetaan solun ylläpitoon, eikä koko substraattimäärää hyödynnetä solun kasvuun, saadaan substraattikulutusta kuvaava yhtälö (43), jota kutsutaan Luedekingin ja Piretin malliksi.

$$-r_S = Y_{XS}^{tod} \mu + m_S \quad (43)$$

missä  $Y_{XS}^{tod}$  kuvaa todellista saantokerrointa ja  $m_S$  on ylläpitovakio.

Metaboliatuotteen muodostumisnopeus, jossa ylläpitotermi on huomioitu, on esitetty yhtälössä (44).

$$r_P = Y_{PS}^{tod} \mu + m_P \quad (44)$$

missä  $Y_{PS}^{tod}$  kuvaa todellista saantokerrointa ja  $m_P$  on ylläpitovakio.

Edellä esitetyt ylläpitoilmiön huomioon ottavat yhtälöt voidaan yhdistää mihin tahansa black box -mallin pohjalta muodostettuun spesifisen nopeuden yhtälöön. Kun saantokerrointen arvot eivät ole vakioita, biomassan havaittu saantokerroin  $Y_{SX}$  voidaan määrittää todellisesta saantokertoimesta yhtälöllä (45). (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

$$Y_{SX} = \frac{\mu}{Y_{XS}^{tod} \mu + m_S} \quad (45)$$

### 7.6.2 Biomassan aiheuttama inhibitio

Contoisen mallissa oletetaan, että biomassa inhiboi solun kasvua. Mallin mukaan biomassa alkaa inhiboida kasvua hyvin korkeissa biomassakonsentraatioissa, jos biomassa täyttää huomattavan osan reaktoritilavuudesta siten, että solujen substraatin saanti häiriintyy. Vaikka mallin on osoitettu kuvaavan hyvin kokeellista dataa, on esitetty, ettei mallin olettaa biomassainhibitiota esiinny todellisessa systeemissä. Biomassainhibition sijaan systeemissä voi vaikuttaa metaboliatuotteiden aiheuttama inhibitio. Contoisen malli on esitetty yhtälössä (46). (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_{XS} X} \quad (46)$$

### 7.6.3 Substraatti-inhibitiomallit

Monodin mallista johdetut substraatti-inhibitiomallit on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1. Monodin mallista johdetut substraatti-inhibitiomallit.

Malli	$\mu$ ja $q$	Yhtälönro.
Aiba <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_{SX})} \exp\left(-\frac{S}{K_I}\right)$	(47)
	$q = q_{\max} \frac{S}{(S + K_{SP})} \exp\left(-\frac{S}{K_{IP}}\right)$	(48)
Andrews <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_S) \left(1 + \frac{S}{K_I}\right)}$	(49)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}}$	(50)
Haldane <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$	(51)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}}$	(52)
Han ja Levenspiel <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{S}{K_I}\right)^{\alpha} \frac{S}{S + K_S \left(1 - \frac{S}{K_I}\right)^{\beta}}$	(53)
	$q = q_{\max} \left(1 - \frac{S}{K_{IP}}\right)^{\alpha} \frac{S}{S + K_{SP} \left(1 - \frac{S}{K_{IP}}\right)^{\beta}}$	(54)
Luong <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_S)} \left(1 - \frac{S}{K_I}\right)^{\alpha}$	(55)
	$q = q_{\max} \frac{S}{(S + K_{SP})} \left(1 - \frac{S}{K_{IP}}\right)^{\alpha}$	(56)

Viite a: (Kumar *et al.*, 2013).

Taulukko 2. Monodin mallista johdetut substraatti-inhibitiomallit.

Malli	$\mu$ ja $q$	Yhtälönro.
Orhon ja Tünay <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{SX} + S + \frac{S \cdot S_I}{K_I}}$	(57)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S + \frac{S \cdot S_{IP}}{K_{IP}}}$	(58)
Sivakumar <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{S}{K_I}\right)^{\alpha} \frac{S}{S + K_{SX} \left(1 - \frac{S}{S_0}\right)^{\beta}}$	(59)
	$q = q_{\max} \left(1 - \frac{S}{K_{IP}}\right)^{\alpha} \frac{S}{S + K_{SP} \left(1 - \frac{S}{S_0}\right)^{\beta}}$	(60)
Yano ja Koga <sup>a</sup>	$\mu = \frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{K_{SX}}{S} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{K_j}\right)^J}$	(61)
	$q = \frac{q_{\max}}{1 + \frac{K_{SP}}{S} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{K_j}\right)^J}$	(62)

Viite a: (Kumar *et al.*, 2013)

#### 7.6.4 Lopputuoteinhibitiomallit

Monodin mallista johdetut lopputuoteinhibitiomallit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Monodin mallista johdetut lopputuoteinhibitiomallit.

Malli	$\mu$ ja $q$	Yhtälönro.
Aiba <sup>b</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{SX} + S} \exp(-K_P P)$	(63)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S} \exp(-K_{PP} P)$	(64)
Ghose ja Tyagi <sup>c</sup>	$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{P}{P_{X\max}} \right)$	(65)
	$q = q_{P\max} \left( 1 - \frac{P}{P_{P\max}} \right)$	(66)
Hinshelwood <sup>c</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{SX} + S} (1 - K_P P)$	(67)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S} (1 - K_{PP} P)$	(68)
Jerusalimsky <sup>d</sup>	$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot K_P}{(K_{SX} + S) \cdot (K_P + P)}$	(69)
	$q = \frac{q_{\max} \cdot S \cdot K_{PP}}{(K_{SP} + S) \cdot (K_{PP} + P)}$	(70)
Levenspiel <sup>b</sup>	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_{SX} + S} \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^a$	(71)
	$q_{\max} \left( \frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n$	(72)
Luong <sup>e</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(S + K_{SX})} \left[ 1 - \left( \frac{P}{P_{X\max}} \right)^a \right]$	(73)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S} \left( 1 - \frac{P}{P_{P\max}} \right)$	(74)
Taylor <sup>d</sup>	$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{(K_{SX} + S) \cdot (1 - K_P \cdot P)}$	(75)
	$q = \frac{q_{\max} \cdot S}{(K_{SP} + S) \cdot (1 - K_{PP} \cdot P)}$	(76)

Viite b: (Birol *et al.*, 1998); Viite c: (Kostov *et al.*, 2012); Viite d: (Zacharof ja Lovitt, 2013); Viite e: (Warren *et al.*, 1990).



### 7.6.5 Yhdistetyt substraatti- ja lopputuoteinhibitiomallit

Monodin mallista johdetut yhdistettyä substraatti- ja lopputuoteinhibitiota kuvaavat mallit on esitetty taulukossa (4).

Taulukko 4. Monodin mallista johdetut yhdistetyt substraatti- ja lopputuotetuoteinhibitiomallit.

Malli	$\mu$ ja $q$	Yhtälönro.
Andrews ja Noack <sup>b</sup>	$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S}{1 + \frac{K_{SX}}{S} + \frac{S}{K_I}} \right)$	(77)
	$q = q_{\max} \left( \frac{S}{1 + \frac{K_{SP}}{S} + \frac{S}{K_{IP}}} \right)$	(78)
Gonçalves et al. <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{S}{S^*} \right)^{\alpha} \left( 1 - \frac{P}{P^*} \right)^{\beta}$	(79)
	$q = q_{\max} \left( 1 - \frac{S}{S^*} \right)^{\alpha} \left( 1 - \frac{P}{P^*} \right)^{\beta}$	(80)
Heuvel ja Beftink <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{SX} + S + \frac{S^2}{K_I}} \frac{K_P}{K_P + P}$	(81)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}} \frac{K_{PP}}{K_{PP} + P}$	(82)
Phisalaphong et al. <sup>a</sup>	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_{SX} + S + \frac{S^2}{K_I}} \left( 1 - \frac{P}{K_P} \right)$	(83)
	$q = q_{\max} \frac{S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}} \left( 1 - \frac{P}{K_{PP}} \right)$	(84)

Viite a: (Kumar *et al.*, 2013); Viite b: (Birol *et al.*, 1998).

### 7.6.6 Epäaktiivisten solujen vaikutus

Kuolleita soluja voi esiintyä prosessissa etenkin jos soluja kierrätetään. Kehittämällä Monod-tyyppiseen kinetiikkaan perustuvaa mallia, jota on laajennettu inhibitiio-termeillä, voidaan mallissa huomioida myös epäaktiivisten solujen vaikutus. Solujen kasvunopeudelle voidaan kirjoittaa yhtälö (85).

$$r_X = \mu_{\max} \left[ 1 - \left( \frac{P}{P_{X\max}} \right)^\alpha \right] \left[ 1 - \left( \frac{X_t}{X_{X\max}} \right)^\beta \right] \frac{SX_v}{K_{SX} + S} \quad (85)$$

Yhtälössä (85) solujen kokonaiskonsentraatio  $X_t$  on

$$X_t = X_v + X_d,$$

Missä  $X_v$  kuvaa elossa olevien solujen määrää ja  $X_d$  kuolleiden solujen määrää. Solujen kuolemisnopeus  $r_d$  voidaan ilmaista yhtälöllä (86).

$$r_d = (k_{1J}\mu + k_{2J})X_v \quad (86)$$

Substraatin kulutusnopeus voidaan ilmaista yhtälöllä (87).

$$r_S = -\frac{r_X}{Y_{XS}} - m_S X_v \quad (87)$$

Kun kuolleiden solujen vaikutus otetaan huomioon, voidaan etanolituotannolle kirjoittaa yhtälö (88). (Jarzębski, A. B. *et al.*, 1989)

$$r_p = aX_v \exp(-bX_v) \quad (88)$$

### 7.7 Moserin malli

Moserin kineettinen malli perustuu inhibitiiovapaaseen substraatin rajoittamaan kineetiikkaan. Moserin malli on kehitetty analogiana allosteerisesta Hillin entsyymikinetiikasta. (Birol *et al.*, 1998) Hillin malli kuvaa allosteerista entsyymiä, jolla on useita substraatin kiinnitysmiskohtina toimivia alayksiköitä. Kun substraatti kiinnittyy yhteen alayksikköön, entsyymien kaikkien alaryhmien konformaatio muuttuu siten, että seuraavien substraattien kiinnittymisaffiniteetti kasvaa ja kiinnittymiseen vaadittava energia-

määrä pienenee. Moserin mallissa entsyymi on korvattu biomassalla, ja malli on samaa muotoa Hillin mallin kanssa. (Horovitz ja Yifrach, 2000)

Spesifinen kasvunopeus ja spesifinen tuotteenmuodostumisnopeus voidaan Moserin mallin mukaan esittää yhtälöillä (89) ja (90), joissa Monodin mallia on muokattu korottamalla substraattipitoisuudet potenssiin  $n$ . (Birol *et al.*, 1998)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S'^n}{S'^n + K_{SX}} \quad (89)$$

$$q = q_{\max} \frac{S'^n}{S'^n + K_{SP}} \quad (90)$$

### 7.8 Tessierin malli

Tessierin kineettisessä mallissa oletetaan, ettei inhibitiota ole, vaan kinetiikkaa rajoittaa substraatin diffuusio. (Birol *et al.*, 1998)

Tessierin malli voidaan esittää yhtälöillä (91) ja (92). (Kostov *et al.* 2012)

$$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - \exp \left( - \frac{S}{K_{SX}} \right) \right) \quad (91)$$

$$q = q_{\max} \left( 1 - \exp \left( - \frac{S}{K_{SP}} \right) \right) \quad (92)$$

### 7.9 Logistinen malli

Logistisella mallilla voidaan kuvata mikrobikasvua. Malli ei kuvaa substraatin kulutusta, vaan mallissa oletetaan, että substraattia on saatavilla riittävästi takaamaan systeemin rajoittama maksimimäärä biomassaa. (Dodic *et al.*, 2012) Logistista funktiota voidaan soveltaa mikrobikasvustojen kasvun empiiriseen kuvaamiseen, jos ravinteet kulutetaan loppuun ennen kuin fermentoinnin lopputuotteiden akkumuloituminen aiheuttaa inhibitiota. Logistisella funktiolla voidaan mallintaa mikrobikasvua populaation tiheyden, ajan tai kasvunopeuden funktiona. (Wachenheim *et al.*, 2003)

Logistinen malli voidaan esittää yhtälöllä (93). (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7)

$$\mu = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{X}{K_{SX}} \right) \quad (93)$$

Logistisessa mallissa populaation tiheyttä ajan funktiona kuvaa sigmoidinen käyrä. Käyrän muoto perustuu mittauksiin, joiden mukaan useilla organismeilla kasvukäyrä muodostaa sigmoidin, kun populaation tiheyttä kuvataan ajan funktiona. Sigmoidisella käyrällä mikrobipopulaation kasvu vähenee, kun populaation koko lähenee saturaatiopisteessä. Saturaatiopiste voi merkitä esimerkiksi ravinteiden loppumista. (Wachenheim *et al.*, 2003)

Logistisessa mallissa oletetaan substraattia olevan prosessia rajoittamaton määrä saatavilla, mutta tässä työssä fermentointia mallinnettaessa on tavoitteena tarkastella riippuvuutta myös substraattipitoisuuden ja hiivan kasvun sekä etanolituotannon välillä. Näin ollen logistista mallia ei tässä työssä sisällytetä simulointimallissa testattaviin kineettisiin malleihin.

## 7.10 Kineettisten mallien lämpötilariippuvuus

Jo pienillä lämpötilanmuutoksilla on merkittävä vaikutus fermentoinnin kinetiikkaan ja kinetiikan kautta tuottavuuteen ja raaka-aineen konversioon. Kirjallisuudesta on saatavilla joitakin matemaattisia malleja, jotka kuvaavat lämpötilan vaikutusta kineettisiin parametreihin. (Rivera *et al.*, 2006)

Parametrin lämpötilariippuvuus voidaan ilmaista yhtälöllä (94).

$$\text{Lämpötilariippuvainen parametri} = A \cdot \exp\left(\frac{B}{T}\right) + C \cdot \exp\left(\frac{D}{T}\right) \quad (94)$$

Yhtälössä (94) A, B, C ja D ovat vakioita. (de Andrade *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2006)

Lämpötilan vaikutusta fermentointikinetiikkaan kuvaavat myös Arrheniuksen laki ja Ratkowskyn malli. Arrheniuksen laki on ilmaistu yhtälössä (95) ja Ratkowskyn malli yhtälössä (96).

$$q_{\max,i} = A_i \cdot e^{-\frac{E_{a_i}}{RT}} \quad (95)$$

$$q_{\max,i} = b_i^* (T - T_{\min,i})^2 \quad (96)$$

missä  $b_i^*$  on Ratkowskyn mallista empiirinen sovitettu parametri [mmol/C-mol<sub>x</sub>/h/K<sup>2</sup>] ja  $T_{\min,i}$  on Ratkowskyn mallin empiirinen parametri [°C]. (Cruz *et al.*, 2012)

Modifioidun Ratkowskyn mallin mukaan maksimaalinen spesifi kasvunopeus voidaan esittää lämpötilan funktiona muodossa (97).

$$\mu_{\max} = [(a_1 \cdot (T - \theta_1)) \cdot (1 - \exp(b_1 \cdot (T - \theta_2)))]^2 \quad (97)$$

On esitetty, että Ratkowskyn malli soveltuu kuvaamaan mikrobikasvun lämpötilariippuvuutta paremmin kuin Arrheniuksen laki.

Etanolin ja sivutuotteiden muodostumisnopeuksien suhde fermentoinnin aikana riippuu lämpötilasta. Kun otetaan huomioon lämpötilan vaikutus, etanolin ja glyserolin spesifiset tuotantonopeudet voidaan määrittää seuraavilla yhtälöillä (98) ja (99).

$$q_P = \alpha_P \mu + \beta_P \quad (98)$$

$$q_G = \alpha_G \mu + \beta_G, \quad (99)$$

joissa parametrit  $\beta_P$  ja  $\beta_G$  voidaan määrittää yhtälöistä (100) ja (101).

$$\beta_P = \gamma_1 \exp\left(-\frac{A_{P1}}{T}\right) - \gamma_2 \exp\left(-\frac{A_{P2}}{T}\right) \quad (100)$$

$$\beta_G = \gamma_3 \exp\left(-\frac{A_{G1}}{T}\right) - \gamma_4 \exp\left(-\frac{A_{G2}}{T}\right). \quad (101)$$

Glukoosin kulutusnopeus voidaan ilmaista yhtälöllä (102), kun glyserolin muodostuminen sivutuotteena otetaan huomioon.

$$q_S = \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{q_P}{Y_{PS}} + \frac{q_G}{Y_{GS}} \quad (102)$$

Solujen kuolemisnopeutta lämpötilan funktiona voidaan arvioida yhtälöllä (103).

$$K_d = K_{db} + \frac{K_{dt}}{1 + \exp(-(T - \theta_3) \cdot \theta_4)} \quad (103)$$

Yhtälössä (103)  $K_{db}$  on spesifi peruskuolemisnopeus ja  $K_{dt}$  lämpötilan määräämä maksimaalinen spesifinen kuolemisnopeus. (Amillastre *et al.*, 2012)

## Soveltava osa

## 8 Fermentointimallin rakentaminen prosessisimulointiohjelmistolla

### 8.1 Simulointityökalu

Tässä työssä etanolifermentoinnin kinetiikkaa mallinnettiin AspenTech-yhtiön valmistamalla Aspen Plus V8.6 -prosessisimulointiohjelmistolla. Aspen-prosessisimulointiohjelmistossa käyttäjän on mahdollista mallintaa reaktion kinetiikka Aspeniin sisäänrakennetuilla malleilla. Koska fermentoinnin kinetiikkaa ei voida muokata Aspenin mallivalikoiman sisältämien kineettisten mallien muotoon, on käyttäjän luotava erillinen kineettinen malli. Käyttäjämalli tuodaan simulointiin Fortran-kielellä ohjelmoidun aliohjelman muodossa.

Aspen Plus V8.6:n käyttämä Fortran-kääntäjä on Intel XE 2011 ja koodin kirjoittamiseen voidaan käyttää Microsoftin Visual Studio -ohjelmaa (2010). Työohjeet aliohjelman luomiseksi Fortranilla ja aliohjelman liittämiseksi Aspen-työkirjaan on esitetty liitteessä 1.

### 8.2 Fermentoinnissa esiintyvien komponenttien kuvaus

Tässä työssä mallinnuksessa fermentoinnin substraatiksi valittiin glukoosi, joka on yksi heksoosisokereista, joita hiiva voi käyttää hiilenlähteenä. Hiiva on elävä organismi, jolle ei voida esittää eksaktia rakennekaavaa. Tämän vuoksi hiivakomponentin mallintaminen simulointiohjelmassa on haastavaa. Mallintamiseen on eri vaihtoehtoja: pseudokomponenttina mallintaminen tai erilaisten mallikomponenttien käyttäminen. Oletuksena komponentin mallinnuksessa on, että hiiva esiintyy systeemissä veteen liuenneena.

Ensimmäinen vaihtoehto hiivan mallinnukselle on pseudokomponentin rakentaminen. Hiivalle voidaan esittää keskimääräisiä molekyylikaavoja, kuten tässä työssä esitetty kaava  $\text{CH}_{1,83}\text{O}_{0,56}\text{N}_{0,17}$ . Keskimääräisen koostumuksen avulla on mahdollista rakentaa Aspeniin käyttäjän luoma pseudokomponentti. Tällöin käyttäjän on kyettävä arvioimaan binäärivuorovaikutusparametrien arvot. Hiiva mallinnetaan vesiliukoisena komponenttina, jolloin parametrien arvot ja aineominaisuudet hiivalle voidaan olettaa



samoiksi kuin veden arvot. Toisaalta tällöin osa hiivasta voi höyrystyä, mikä ei kuvaa todellisuutta. Veden sijasta on mahdollista arvioida hiivan parametreja ja aineominaisuuksia jonkin raskaamman komponentin arvoilla.

Toinen vaihtoehto kuvata hiivaa on käyttää mallikomponenttina jotakin hiiltä, vetyä, happea ja tyypeä sisältävää komponenttia (CHON-komponentti). Mallikomponentti voidaan tällöin valita esimerkiksi proteiinien joukosta. Komponentiksi voidaan valita proteiini, joka esiintyy todellisessa hiivasolussa. Aspenin tietokannassa on useita proteiineja, mutta vain osalle on saatavilla aineominaisuuksien ja systeemin muiden komponenttien suhteen määritetyt vuorovaikutusparametrien arvot. Lysiini on proteiini, jolle Aspenin tietokannassa on valmiina saatavilla vuorovaikutusparametrien arvot, ja joka esiintyy hiivan rakenteessa.

Sekä keskimääräistä hiivasolua kuvaavalla pseudokomponentilla että CHON-komponentilla hiivaa mallinnettaessa on mahdollista ottaa huomioon ammoniakin saatavuuden vaikutus hiivan kasvuun. Toisaalta saatavilla olevassa kirjallisuudessa ei ole tässä työssä ammoniakin kulutuksen mallituksessa käytettäväksi soveltuvaa kineettistä mallia. Lisäksi hiiva kykenee kasvamaan vaihtelevissa ammoniakkipitoisuuksissa ja kykenee sopeuttamaan elintoimintojaan siten, että elintoiminnot voivat jatkua vaihtelevia aikoja ammoniakin loppumisen jälkeen. Tämän ilmaiseminen siten, että Aspen-mallin massatase pätee, on haastavaa. Edellä mainittujen seikkojen vuoksi tässä työssä ammoniakin kulutusta ei otettu huomioon fermentointimallissa.

Jos ammoniakin kulutusta ei mallinneta, tyypeä sisältävän hiivakomponentin kasvua ei ole mahdollista tarkastella. Tällöin hiiva on kuvattava yksinkertaisena komponenttina, jolla on esimerkiksi glukoosin ainearvot ja rakennekaava. Glukoosilla kuvattaessa hiiva on simuloinnin kannalta substraattia, joka ei reagoi etanoliksi ja hiilidioksidiksi. Tällöin myös eliminoiduu tilanne, jossa kaikkia termodynamiikan ja komponenttien välisten vuorovaikutusten kuvaamiseen vaadittavia parametreja ei ole saatavilla tai jossa veden arvoja käytettäessä hiivaa höyrystyisi. Tässä työssä hiivaa kuvaavaksi komponentiksi valittiin komponentti, jolla on glukoosin rakennekaava ja aineominaisuudet. Simulointisysteemin komponentit on esitetty taulukossa (5).

Taulukko 5. Simulointisysteemin komponenttien määrittely.

Komponentti	Komponentin nimi Aspenin tietokannassa	Molekyylikaava
Glukoosi	Dextrose	$C_6H_{12}O_6$
Etanoli	Ethanol	$C_2H_6O_2$
Hiilidioksidi	Carbon-dioxide	$CO_2$
Vesi	Water	$H_2O$
Hiiva	Dextrose	$C_6H_{12}O_6$

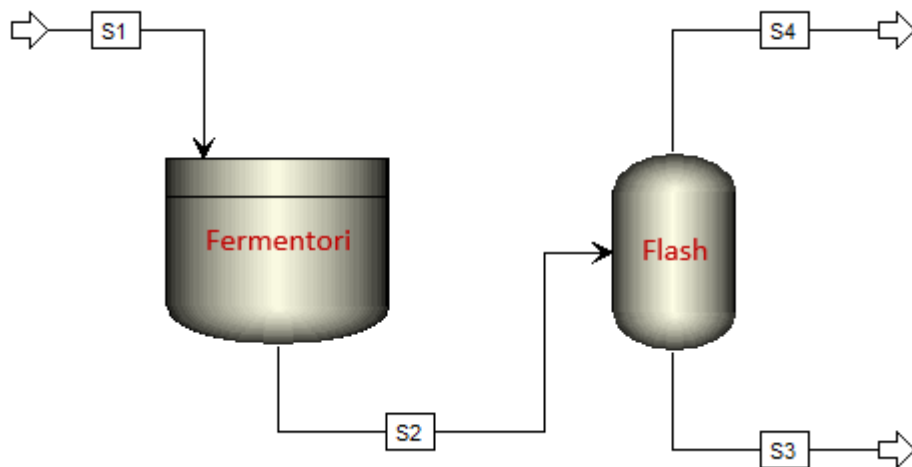
Tämän työn fermentointisysteemin komponenttien mallinnukseen käytettiin Wilsonin mallia. Wilsonin mallilla on mahdollista kuvata voimakkaasti epäideaalisia systeemejä, joissa ei esiinny kahta tai useampaa nestefaasia. Tämän vuoksi Wilsonin malli soveltuu vesi–etanoli-seoksien kuvaamiseen. Systeemin mallinnuksessa otettiin huomioon hiilidioksidin jakautuminen neste- ja kaasufaasiin. Hiilidioksidin liukeneminen nesteeseen kuvattiin Henryn lailla ja kaasufaasiin rikastuvaa hiilidioksidia kuvattiin ideaalikaasuna.

### 8.3 Fermentointilaitteisto ja virtauskaavio simulointimallissa

Tässä työssä mallinnettiin panosfermentointia, jossa panos syötetään reaktoriin prosessin ajovaiheen aluksi ja poistetaan prosessin ajovaiheen lopuksi. Fermentorina käytettiin panosreaktoria (RBatch), jossa kinetiikka on mahdollista kuvata käyttäjän luomalla aliohjelmalla. Muissa Aspenin panostyyppisissä reaktoreissa (saantoreaktori, stoikiometrinen reaktori) ei tätä mahdollisuutta ole. Panosreaktorisysteemi on dynaaminen, mutta Aspen-ympäristössä laskenta perustuu vakiotilaoletukselle. Näin ollen Aspenissa panosreaktoriin syötettävä panos määritellään massavirtana aikayksikköä kohti ja panoksen koko on panosaika kerrottuna käyttäjän määrittelemällä keskimääräisellä massavirralla.

Prosessissa muodostuvasta hiilidioksidista osa liukenee nestefaasiin ja osa muodostaa kaasufaasin. Flash-laskenta voidaan suorittaa RBatch-yksikössä, mutta kineettisen mallin parametrien sovittaminen ja höyry–neste-tasapainon laskenta samassa yksikössä hidastavat laskennan konvergointia merkittävästi. Tämän vuoksi faasien jako

suoritettiin simulointimallissa fermentorin jälkeisessä Flash2-yksikössä. Flash-yksikkö on jatkuvatoiminen. Mallinnettavan systeemin virtauskaavio on esitetty kuvassa (20).



Kuva 20. Simuloinnin virtauskaavio. Virta S1 on fermentoriin syötettävä panos, S2 fermentorista lopuksi poistettava tuote, S3 flash-yksikössä erottuva nestevirta ja S4 flash-yksikössä erottuva kaasuvirta.

#### 8.4 Fermentoinnin esittäminen reaktioyhtälöllä

Aspenin RBatch-blokissa käyttäjän tulee määritellä reaktorissa tapahtuvien reaktioiden reaktioyhtälöt. Hiivan aineenvaihdunta on mahdollista esittää kokonaisreaktioyhtälönä, jossa reaktioyhtälön kertoimina ovat saantokertoimet. Sokerin jakautuminen hiivan kasvuun liittyvän ja fermentatiivisen metabolian välillä ei ole vakio, minkä vuoksi eri ajanhetkillä saantokertoimien arvot vaihtelevat. Näin ollen vakiokertoimisen kokonaisreaktioyhtälön käyttäminen ei kuvaa todellisuutta.

Hiivan fermentatiivisessa aineenvaihdunnassa syntyvän hiilidioksidin ja etanolin suhde ei ole aina vakio koko fermentoinnin ajan. Tässä työssä oletettiin kuitenkin, että koko fermentoinnin ajan etanolin ja hiilidioksidin muodostumiselle glukoosista pätee luvussa 3.2.2. esitetyn kuvan (4) mukaan reaktioyhtälö (104).



Kun ylläpitoilmiötä ei oteta huomioon ja oletetaan, että kaikki kulunut substraatti liittyy hiivan massan lisääntymiseen ja etanolintuotantoon, voidaan substraatin

vähennemisnopeus laskea hiivan ja etanolin tuotantonopeuksista. Etanolintuotantoon liittyvä substraattikulutus saatiin yhtälöstä (104), ja syntyneen hiivan massa oletettiin samaksi kuin sen kasvuun kuluneen substraatin massa. Substraattina simuloinnissa toimiva glukoosi ei sisällä typpeä. Mittausdatassa sen sijaan biomassan kasvuun sisältyy myös typpilähteen tuottama biomassan lisäys. Näin ollen tässä työssä simuloinnissa samalla substraattimäärällä saatiin aikaan yhtä suuri biomassan kasvu kuin mittausdatassa substraatin ja typpilähteen summana.

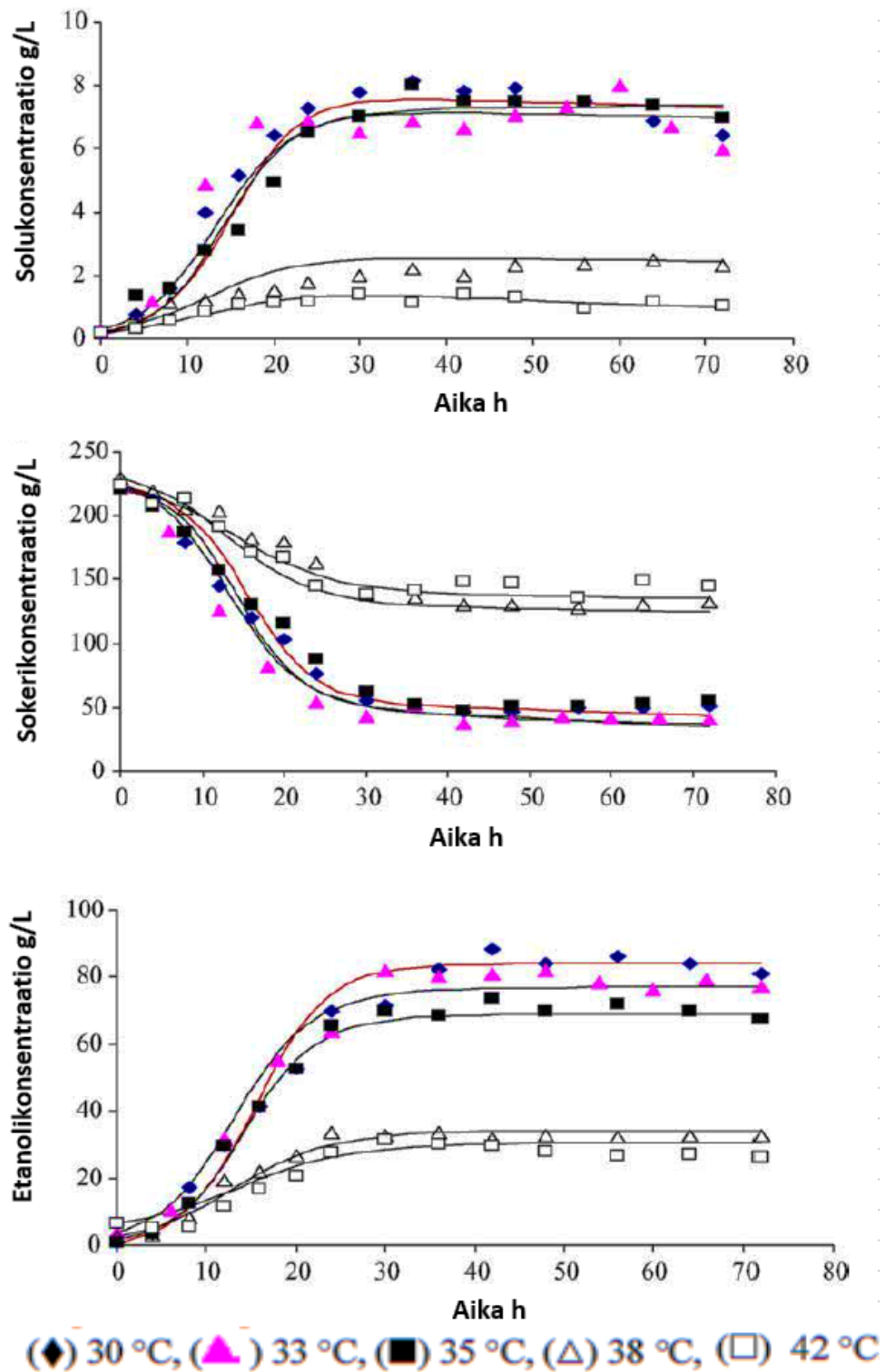
Veden osuus liuoksesta massaprosentteina voi panosfermentoinnin alussa olla esimerkiksi 80 %:a. Näin ollen fermentoinnissa muodostuvan veden vaikutus systeemin sisältämän veden kokonaismäärään on lähes merkityksetön, ja veden muodostumisnopeus voitiin mallissa olettaa nollassa.

Kun simuloinnissa kinetiikka kuvataan käyttäjän muodostamalla User-mallilla, Aspen ei huomioi reaktoriblokille määriteltyä reaktioyhtälöä systeemin ratkaisussa. Aspen ei tarkasta massatasetta Aspeniin määritellyn reaktioyhtälön perusteella, vaan laskee komponenttien pitoisuudet käyttäjämallin antamilla reaktionopeuksilla. Näin ollen stoikiometrian oikeellisuus on varmistettava käyttäjän muodostamassa kinetiikka-aliohjelmassa.

## **8.5 Mallien sovittamiseen käytettävä fermentointikoedata**

Tässä työssä kineettisten mallien soveltuvuutta testattiin ja mallien parametrit sovitettiin kirjallisuudesta hankitun fermentointikoedatan perusteella.

Phisalaphong *et al.* (2006) ovat suorittaneet panosfermentointikokeita *S. cerevisiae* M30 -kannalla kasvuliuoksessa, jossa hiilenlähteenä on ruokosokerimelassista valmistettu sokeriliuos. Fermentoinnit on suoritettu 250 ml:n kokonaisnestetilavuudessa Erlenmeyer-pulloissa ravistellussa viljelykaapissa. Fermentoinnin on annettu edetä 72 tunnin ajan isothermisissä olosuhteissa eri lämpötiloissa. Fermentoinnin aikana on mitattu biomassan, etanolin ja fermentoituvien sokerien kokonaiskonsentraatiota fermentoinnin alusta stationäärivaiheeseen saakka. Eri lämpötiloissa kerätty mittausdata on esitetty kuvassa (21).



Kuva 21. Pisteet kuvaavat fermentoituvien sokereiden kokonaiskonsentraatiota, sekä etanoli- ja solukonsentraatioita ajan funktiona panosfermentoinnissa eri lämpötiloissa. (Phisalaphong *et al.*, 2006)

Phisalaphongin *et al.* (2006) panoskokeissa korkein etanolipitoisuus saavutetaan fermentointilämpötilassa 30 °C. Näin ollen tässä työssä käytettiin lämpötilassa 30 °C kerättyä dataa, joka on esitetty taulukossa (6). Phisalaphongin *et al.* (2006) mittausdataan viitataan tässä työssä nimellä Data 1.

Taulukko 6. Data 1. Biomassa-, etanoli- ja sokerikonsentraatiot koedatassa T=30 °C. Massatase 1: massataseen toteutuminen, kun syntyvää hiilidioksidia ei ole huomioitu. Massatase 2: massataseen toteutuminen, kun syntyvä hiilidioksidi on huomioitu. Tase2 virhe %:a/ lähtötil.: Massataseen 2 virhe prosentteina lähtötilanteen (t=0) kokonaiskonsentraatiosta. Tase2 virhe %:a/ P: massataseen 2 virhe prosentteina etanolikonsentraatiosta kullakin mittausajanhetkellä. (Phisalaphong *et al.*, 2006)

Mittausdata, T = 30°C				Datan analyysi				
t (h)	S (g/L)	P (g/L)	X (g/L)	Massatase1 (g/L)	CO2 (g/L)	Massatase2 (g/L)	Tase2 virhe %:a/lähtötil.	Tase2 virhe %:a/ P
0,00	225,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	
4,00	180,00	18,00	0,80	-26,30	17,20	-9,10	-4,58	-25,44
8,00	143,75	30,00			28,66			
12,50			4,00					
16,00	120,00	42,00	5,20	-57,90	40,12	-17,78	-10,63	-25,31
20,00	102,50	53,30	6,50	-62,80	50,92	-11,88	-7,32	-13,73
24,00	75,00	70,00	7,25	-72,85	66,87	-5,98	-3,93	-5,61
30,00	55,00	71,00	7,75	-91,35	67,83	-23,52	-17,59	-24,77
36,00	51,00	81,00	8,20	-84,90	77,38	-7,52	-5,36	-6,62
42,00	49,00	88,00	7,80	-80,30	84,07	3,77	2,60	2,96
48,00	50,00	82,00	7,90	-85,20	78,34	-6,86	-4,91	-5,98
56,00	50,00	83,00	7,50	-84,60	79,29	-5,31	-3,78	-4,55
64,00	50,00	82,00	6,90	-86,20	78,34	-7,86	-5,66	-6,90
72,00	50,00	80,00	6,50	-88,60	76,43	-12,17	-8,92	-11,15

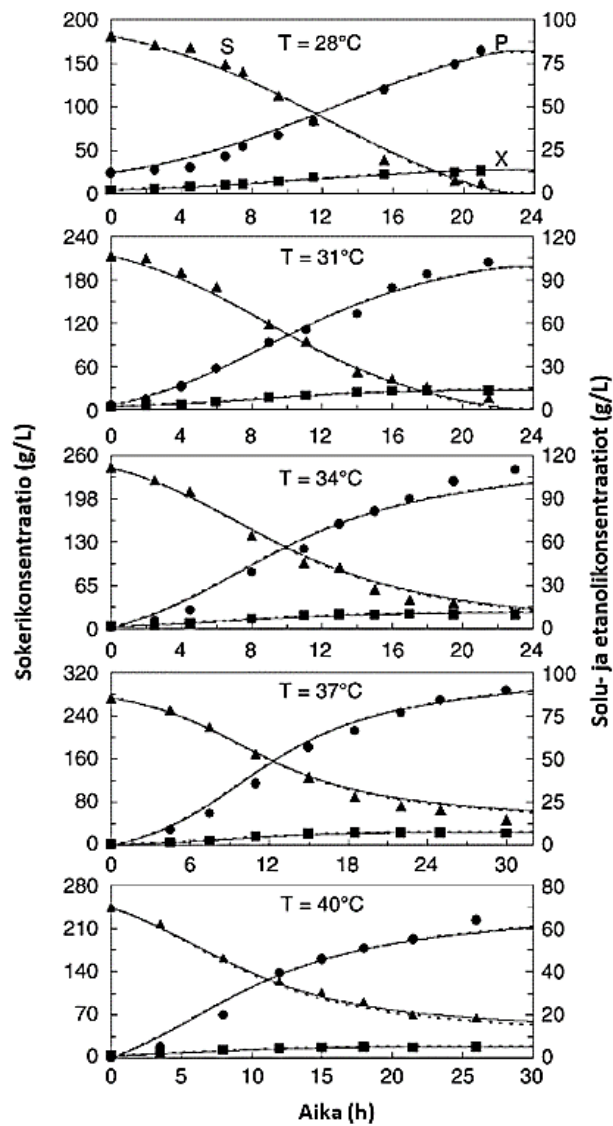
Kun tarkastellaan massataseen (Massatase 1) toteutumista fermentoinnin aikana, havaitaan, että substraatin, etanolin ja biomassan määrä eri ajanhetkillä ei selitä kaikkea glukoosimäärän muutosta, vaan mitattujen komponenttien kokonaismassa vähenee. Massan vähenemistä voidaan osittain selittää muodostuvalla hiilidioksidilla, joka poistuu fermentointiastasta. Syntyvän hiilidioksidin määrää voidaan arvioida etanolikonsentraation avulla reaktioyhtälön (104) perusteella. Kun muodostetaan uusi massatase (Massatase 2), jossa hiilidioksidin muodostuminen on huomioitu, havaitaan, että puuttuvaa massaa ei voida selittää täysin hiilidioksidin muodostumisella. Puuttuva

massa voidaan selittää hiivan metaboliassa muodostuvien sivutuotteiden, kuten glyserolin, syntymisellä, joiden pitoisuuksia ei ole lähteessä raportoitu.

Kun massataseen (Massatase 2) virheen prosentuaalinen osuus alkuperäisestä kokonaispitoisuudesta lasketaan, huomataan virheen vaihtelevan välillä -17,59...2,60 %:a. Kun massataseen (Massatase 2) virheen prosentuaalinen osuus etanolipitoisuudesta lasketaan, havaitaan, että osuus ei ole vakio. Näin ollen glyserolin ja muiden sivutuotteiden muodostumista ei voida approksimoida suoraan etanolin muodostumisnopeuden perusteella. Sivutuotteiden muodostuminen olisi mahdollista huomioida simuloinnissa valekomponentin (dummy component) avulla. Tällöin valekomponentin tuotantonopeudelle olisi muodostettava oma kineettinen malli. Edellä mainittua mallia ei tässä työssä muodostettu.

Massataseen virhettä voidaan osaltaan selittää myös mittausvirheillä, sekä mahdollisen kontaminaation seurauksena muodostuvilla sivutuotteilla, esim. maitohapon muodostumisella. Phisalaphong *et al.* (2006) ei ole kuitenkaan raportoinut mahdollisen kontaminaation seurauksena muodostuneiden komponenttien pitoisuuksia.

Rivera *et al.* (2006) ovat suorittaneet panosfermentointikokeita käyttäen *S. cerevisiae* -hiivaa fermentoivana mikrobina. Fermentorin kokonaisfermentointilavuus on ollut 2,5 litraa. Hiilenlähteenä fermentoinnissa on käytetty laimennettua sokeriruokomelassia. Fermentoinnin aikana on määritetty solujen, etanolin ja fermentoituvien sokereiden kokonaiskonsentraatiot, jotka on esitetty kuvassa (22).



Kuva 22. Pisteet kuvaavat fermentoituvien sokereiden kokonaiskonsentraatiota, sekä etanoli- ja solukonsentraatioita ajan funktiona panosfermentoinnissa eri lämpötiloissa. (Rivera *et al.*, 2006)

Riveran *et al.* (2006) mittaustuloksista valittiin simuloointeihin 31 °C:ssa kerätty data, sillä kyseinen lämpötila on lähimpänä Phisalaphongin *et al.* (2006) mittauksissa käytettyä 30 °C:n lämpötilaa. Lämpötilassa 31 °C mitattu data on esitetty taulukossa (7). Riveran *et al.* (2006) mittausdataan viitataan tässä työssä nimellä Data 2.



Taulukko 7. Data 2. Biomassa-, etanoli- ja sokerikonsentraatiot koedatassa T=31 °C. Massatase 1: massataseen toteutuminen, kun syntyvää hiilidioksidia ei ole huomioitu. Massatase 2: massataseen toteutuminen, kun syntyvä hiilidioksidi on huomioitu. Tase2 virhe %:a/ lähtötil.: massataseen 2 virhe prosentteina lähtötilanteen (t=0) kokonais-konsentraatiosta. (Rivera *et al.*, 2006)

Mittausdata, T = 31°C				Datan analyysi			
t (h)	S (g/L)	P (g/L)	X (g/L)	Massatase1 (g/L)	CO2 (g/L)	Massatase2 (g/L)	Tase2 virhe %:a/lähtötil.
0	213,00	2,60	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00
2	210,00	4,50	2,50	-0,50	4,30	3,80	1,75
4	187,50	15,00	3,80	-11,20	14,33	3,13	1,52
6	165,00	30,00	10,00	-12,50	28,66	16,16	7,88
9	119,00	45,00	11,00	-42,50	42,99	0,49	0,28
11	90,00	55,00	11,25	-61,25	52,54	-8,71	-5,57
14	50,00	67,50	14,00	-86,00	64,48	-21,52	-16,36
16	40,00	85,00	14,50	-78,00	81,20	3,20	2,30
18	30,00	93,75	14,50	-79,25	89,56	10,31	7,46
22	12,00	102,00	14,50	-89,00	97,44	8,44	6,57

Kun tarkastellaan massataseen (Massatase 1) toteutumista fermentoinnin aikana, havaitaan, että massatase ei toteudu. Kun syntyvän hiilidioksidin määrä arvioidaan etanolikonsentraation avulla reaktioyhtälön (104) perusteella (Massatase 2), havaitaan massataseen toteutuvan paremmin. Näin ollen sivutuotteiden syntyminen ei ole yhtä merkittävää kuin Phisalaphongin *et al.* (2006) kokeissa. Kuitenkin hiilidioksidin huomioimisen myötä tapahtuva kokonaismassan näennäinen kasvu osoittaa, että datassa voi esiintyä mittausvirheitä. Kun tarkastellaan massataseen 2 virhettä prosentteina alkuperäisestä kokonaiskonsentraatiosta, havaitaan prosenttiosuuksien vaihtelevan välillä -16,36...7,88 %:a.

Kummallekaan datajoukolle ei ole lähteissä annettu arviota tulosten keskihajonnasta, eikä hajonnan laskemiseksi ole saatavilla toistomittauksia samoissa mittausolosuhteissa. Tämän vuoksi simuloinneissa keskihajonnaksi olettiin tässä työssä 1 g/L.

## 8.6 Kineettisten mallien sovittaminen mittausdataan

Kun mallien soveltuvuutta mittausdatan kuvaamiseen testattiin, käytettiin simuloinnin asetuksina koetilanteita vastaavia operointiolosuhteita ja komponenttien alkupitoisuuksia. Kokonaisvirtausnopeudeksi panosfermentorin voidaan asettaa esimerkiksi 10 kg/h. Aspenin laskentatavan vuoksi komponenteille, joiden todellinen alkupitoisuus on nolla, asetettiin hyvin matala alkupitoisuus. Komponentin pitoisuuden ollessa nolla, on mahdollista, että Aspen poistaa tämän komponentin systeemistä, eikä huomioi kyseistä komponenttia laskennassa. Alkupitoisuudet, sekä panosfermentorin ja flash-kolonnin asetukset molemmille mittausdatoille (Data 1 ja Data 2) on esitetty taulukossa (8).

Taulukko 8. Komponenttien virtaamat syötevirrassa, syöttövirran olosuhteet, sekä fermentorin ja flash-yksikön ajoasetukset Data 1:lle ja Data 2:lle.

	Data 1	Data 2	Yksikkö
<b>Syöttövirta</b>			
Lämpötila	30	31	°C
Paine	1	1	bar
Kokonaisvirta	10	10	kg/h
<b>Komponentit</b>			
Glukoosi	2,0079	1,9184	kg/h
Etanoli	$1,00 \cdot 10^{-14}$	$2,60 \cdot 10^{-3}$	kg/h
CO <sub>2</sub>	$1,00 \cdot 10^{-14}$	$1,00 \cdot 10^{-14}$	kg/h
Vesi	7,9912	8,0644	kg/h
Hiiva	0,0009	0,0171	kg/h
<b>Fermentori</b>			
Lämpötila	30	31	°C
Paine	1	1	bar
Reaktiofaasi	Neste	Neste	
<b>Flash</b>			
Lämpötila	30	31	°C
Paine	1	1	bar
Faasit	Höyry ja neste	Höyry ja neste	

Kinetiikan mallinnukseen käytetyn aliohjelman Fortran-koodi on esitetty liitteessä 2. Käytettäessä käyttäjän luomia kineettisiä malleja (User-kinetiikka) Aspenissa, käytettiin

biomassa-, substraatti- ja etanolikonsentraatioiden sijaan komponenttien mooliosuuksia. Tällöin mallien sovitettavien kineettisten parametrien yksiköt eivät ole samat kuin aikaisemmin tässä työssä esitetyt parametrien yksiköt. Aspen sovittaa parametrit siten, että kohdefunktio (mittausarvojen ja laskettujen arvojen erotusten neliöiden summa) saavuttaa minimin optimoiduilla parametrien arvolla.

Yleisesti tarkasteltuna tässä työssä testattujen kineettisten mallien parametrien sovittaminen Aspenilla on haastavaa. Mallin parametrien arvoille on olemassa useita kombinaatioita, joilla systeemi konvergoi. Vaikka parametrien optimointi simulointitulosten perusteella konvergoi, eli saavuttaa ainakin näennäisesti kohdefunktion minimin, mitattuja ja laskettuja arvoja vertailtaessa havaitaan usein, että erityisesti biomassakonsentraatioiden osalta mitatut ja lasketut pisteet poikkeavat toisistaan merkittävästi. Toisaalta on mahdollista löytää parametrien arvoille ratkaisuja, joilla systeemi ei konvergoi, mutta joilla mitatut ja mallin mukaan lasketut pisteet ovat graafisesti tarkasteltuina lähellä toisiaan.

Simulointien perusteella käytetyillä parametrien alkuarvauksilla on merkittävä vaikutus parametrien sovituksen onnistumiseen. Sovituksessa parametrien arvot voivat konvergoitua paikallisiin minimeihin. Joissakin tapauksissa parametrien sovitus ei konvergoi. Edellä mainitut tapahtumat eivät välttämättä merkitse mallin soveltumattomuutta datan kuvaamiseen, vaan kyseessä voivat olla epäoptimaaliset alkuarvaukset, joista optimointialgoritmi ei kykene saavuttamaan globaalia kohdefunktion minimiä, jonka lähtökohtaisesti tulisi tuottaa optimaalinen sovitus.

Alkuarvauksista riippuen voidaan parametrien arvojen sovituksessa päätyä useisiin eri ratkaisuihin, joihin optimointi konvergoi. Muuttamalla sallittujen iterointikierrosten maksimilukumäärää ja virherajoja on samoilla alkuarvauksilla ja reunaehdoilla mahdollista päätyä eri ratkaisuihin. Tämän perusteella mallien sovittamisessa on optimaalisen lopputuloksen saavuttamiseksi suoritettava useita simulointeja mahdollisimman monien ratkaisujen löytämiseksi. Näistä ratkaisuista voidaan valita se, joka tuottaa parhaan sovituksen suhteessa mitattuihin arvoihin. Toisaalta jatkuvasti on olemassa mahdollisuus, että parasta sovitusta tai globaalia kohdefunktion minimiä ei ole löydetty kokeilluilla alkuarvauksilla.

Tässä työssä kineettisten mallien soveltuvuutta mittausdatan kuvaamiseen arvioitiin ensiksi konvergoinnin perusteella. Näin karsittiin mallit, joiden parametrien sovitus ei konvergoitunut tai joiden parametrien sovittamisessa päädyttiin paikalliseen minimiin, jossa minimoitavan kohdefunktion arvo jää suureksi useista parametreille annetuista alkuarvauksista huolimatta. Toisessa vaiheessa mallien hyvyyttä arvioitiin graafisesti pitoisuuskäyrien perusteella. Kolmannessa vaiheessa kuvien perusteella valittujen mallien parametrien sovittumista arvioitiin korrelaatiomatriisin avulla.

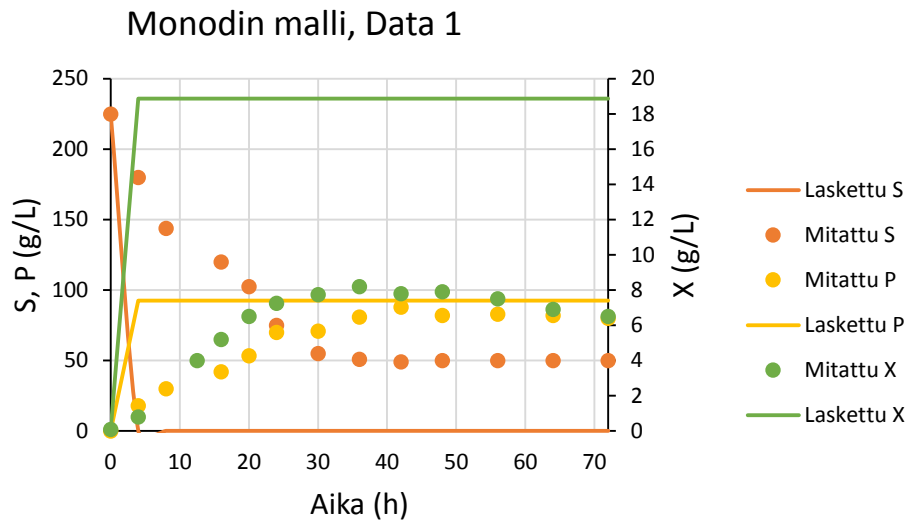
Koska kaikkien mallien sovitettavien parametrien arvoille ei ole saatavilla kirjallisuudesta tässä työssä käytetyille datajoukoille sovitettuja arvoja, ei saatuja tuloksia voitu verrata kirjallisuusarvoihin. Vertailuarvojen puuttuessa keskihajonnan avulla on haastavaa määrittää sitä, kuinka tarkka parametrien sovitus on. Aspenin ilmoittama 95 prosentin luottamusväli perustuu käyttäjän simulointiohjelmistolle antamaan arvioon mitattujen datapisteiden keskihajonnasta. Näin ollen käyttäjän tekemä oletus mitatun datan keskihajonnasta vaikuttaa luottamusvälin laajuuteen, eikä luottamusväli kuvaa aukottomasti parametrien sovituksen todellista luotettavuutta. Edellä esitettyjen seikkojen vuoksi tässä työssä mallien tarkastelussa ei otettu huomioon keskihajontaa eikä luottamusväliä.

Kullakin mallilla suoritetuissa simuloinneissa tarkastettiin, että massatase toteutui ja lämpötila oli fermentorissa vakio 0,001 °C:n tarkkuudella koko fermentoinnin ajan. Nämä kriteerit täyttyivät jokaisella seuraavissa luvuissa tarkasteltavalla mallilla.

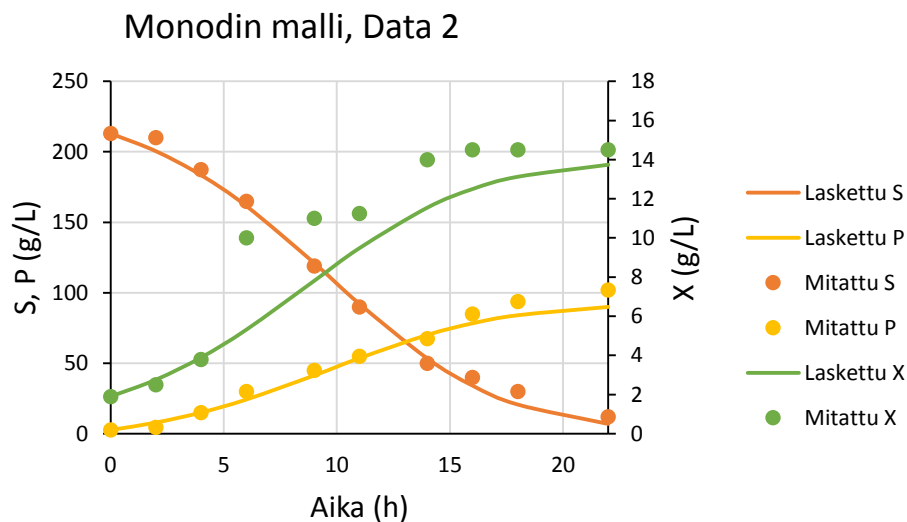
Simulointimallissa höyry–neste-erotus suoritettiin erillisessä flash-kolonnissa, jolloin fermentorissa kaasun määrä kasvaa panosfermentointivaiheen ajan. Tällöin hiilidioksidia liukenee nestefaasiin enemmän kuin todellisessa fermentointiprosessissa, jossa hiilidioksidia poistetaan fermentorista jatkuvasti. Tarkastettaessa hiilidioksidin määrä flash-yksiköstä ulos tulevassa nestevirrassa, sen havaittiin olevan korkeintaan 0,07 mol-%:a koko nestevirrasta. Näin ollen voitiin olettaa, ettei erillisen flash-yksikön käytöstä aiheutunut merkittävää virhettä faasien pitoisuuksien laskentaan ja simulointituoksiin.

### 8.6.1 Monodin malli

Kuvassa (23) on esitetty Monodin mallin (yhtälöt 40 ja 41) sovitukset dataan 1 ja kuvassa (24) Monodin mallin sovitukset dataan 2.



Kuva 23. Monodin mallin (yhtälöt 40 ja 41) sovitukset dataan 1.



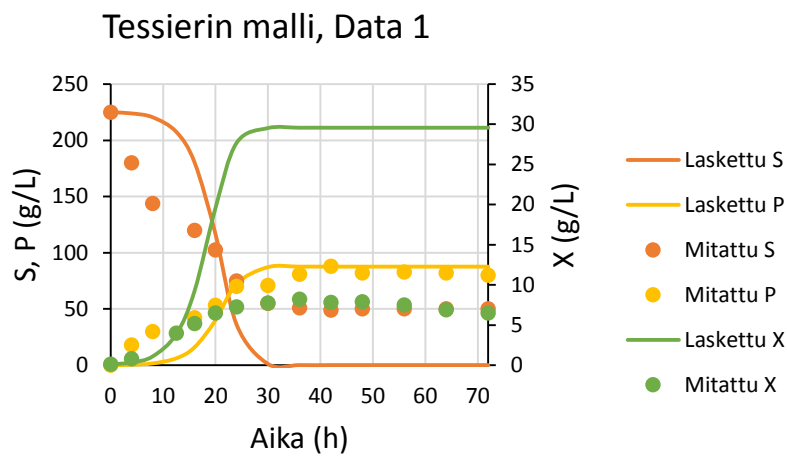
Kuva 24. Monodin mallin (yhtälöt 40 ja 41) sovitukset dataan 2.

Kuten kuvista (23) ja (24) on havaittavissa, Monodin malli ennustaa merkittävästi tarkemmin datan 2 kuin datan 1 mukaista fermentointia. Dataan 1 sovitettaessa malli ennustaa substraatin kuluun loppuun fermentoinnin alussa. Heikon sovituksen vuoksi

on löydettävä jokin Monodin mallin modifikaatio tai muu kineettinen malli, jolla olisi mahdollista kuvata erimuotoiset biomassan kasvukäyrät.

### 8.6.2 Moserin, Contoisen ja Tessierin mallit

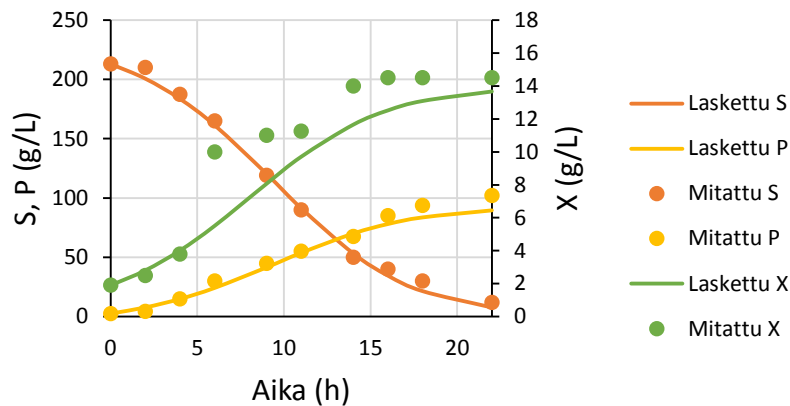
Moserin (yhtälöt 89 ja 90) ja Contoisen mallien (yhtälö 46) sovitukset tässä työssä käytettyihin datajoukkoihin ei konvergoineet. Tessierin malli sovitettiin molempiin datoihin. Tessierin mallin (yhtälöt 91 ja 92) sovitukset datoihin 1 ja 2 on esitetty kuvissa (25) ja (26).



Kuva 25. Tessierin mallin (yhtälöt 91 ja 92) sovitus dataan 1.

Kuten kuvasta (25) havaitaan, dataan 1 sovitettuna parametrien arvot konvergoituvat ratkaisuun, jossa malli ennustaa, että substraatti kuluu loppuun fermentoinnin 30 ensimmäisen tunnin aikana, ja jossa biomassalle laskettu konsentraatio ylittää merkittävästi jokaisen mitatun pisteen arvon lähes koko fermentoinnin ajan.

Tessierin malli, Data 2



Kuva 26. Tessierin mallin (yhtälöt 91 ja 92) sovitukset dataan 2.

Kuvan (26) mukaan Tessierin mallilla voidaan kuvata substraattikulutusta ja etanolinmuodostusta silmämääräisesti hyvällä tarkkuudella koko fermentoinnin ajan. Biomassapitoisuudelle Tessierin malli antaa viiden tunnin jälkeen mitattuja arvoja alempia lukuarvoja. Koska Tessierin malli kuvaa kohtuullisella tarkkuudella ainoastaan dataa 2, mutta mallin sovitukset dataan 1 ei ole riittävän tarkkoja, Moserin, Contoisin ja Tessierin malleja ei tarkastella tässä työssä syvemmin.

### 8.6.3 Substraatti-inhibitiomallit

Tässä työssä testatut substraatti-inhibitiomallit on esitetty luvun 7.6.3 taulukoissa (1) ja (2). Näistä malleista Andrews, Aiba, Orhon ja Tüney, Luong, sekä Han ja Levenspiel konvergoivat molempien datojen perusteella sovitettaessa paikalliseen minimiin. Haldanen, sekä Yanon ja Kogan mallien sovitukset konvergoivat datalla 2, mutta datalla 1 sovitukset konvergoivat paikalliseen minimiin. Sivakumarin mallin sovitukset ei konvergoineet kumpaankaan datajoukkoon. Edellä esitettyjen seikkojen perusteella substraatti-inhibitiomalleja ei tarkastella tässä työssä syvällisemmin.

#### **8.6.4 Yhdistetyt substraatti- ja lopputuoteinhibitiomallit**

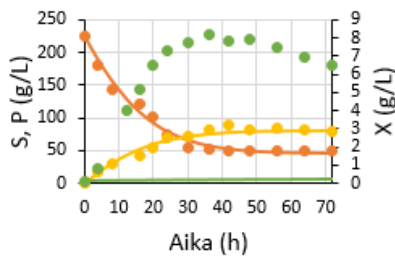
Tässä työssä testatut yhdistetyt substraatti- ja lopputuote-inhibitiomallit on esitetty luvun 7.6.5. taulukossa (4). Näistä malleista Andrewsian ja Noackin mallin sovitus konvergoi datalla 2, mutta datalla 1 sovitus konvergoi paikalliseen minimiin. Heuvelin ja Beeftinkin, Gonçalvesin ja Phisalaphongin mallien sovituksat konvergoivat paikalliseen minimiin. Edellä esitettyjen seikkojen perusteella yhdistettyjä substraatti- ja tuoteinhibitiomalleja ei tarkastella tässä työssä syvällisemmin.

#### **8.6.5 Lopputuoteinhibitiomallit**

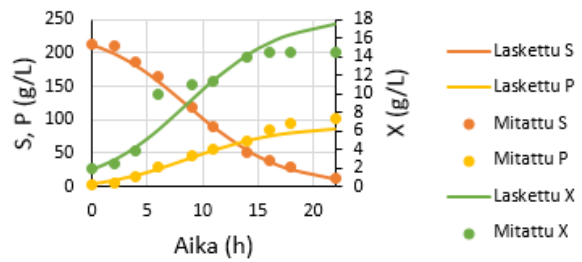
Tässä työssä testatut lopputuoteinhibitiomallit on esitetty luvun 7.6.4. taulukossa (3). Hinshelwoodin mallin sovitus dataan 1 konvergoi, mutta sovitus dataan 2 konvergoi paikalliseen minimiin. Taylorin mallin sovitus ei konvergoinut. Levenspielin (yhtälöt 71 ja 72), Luongin (yhtälöt 73 ja 74), Aiban (63 ja 64), Jerusalimskyn (69 ja 70), sekä Ghosen ja Tyagin (65 ja 66) mallien sovituksat konvergoivat molempien datajoukkojen osalta. Edellämainituista malleista kummankin datajoukon osalta konvergoineiden mallien sovituksat on esitetty kuvissa 27 ja 28.



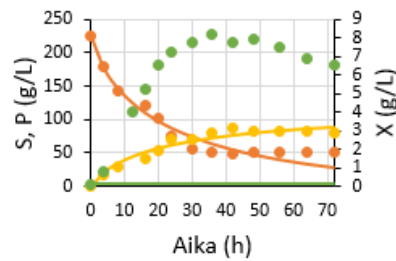
Hinshelwoodin tuoteinhibitiomalli,  
Data 1



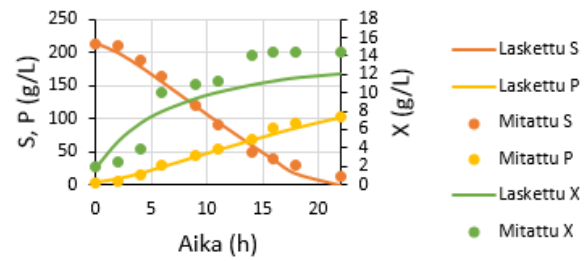
Hinshelwoodin tuoteinhibitiomalli,  
Data 2



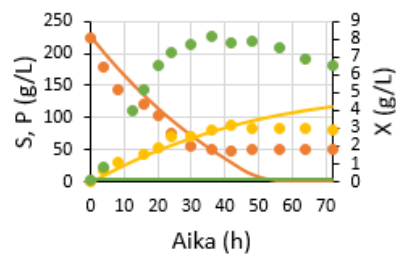
Jerusalimskyn tuoteinhibitiomalli,  
Data 1



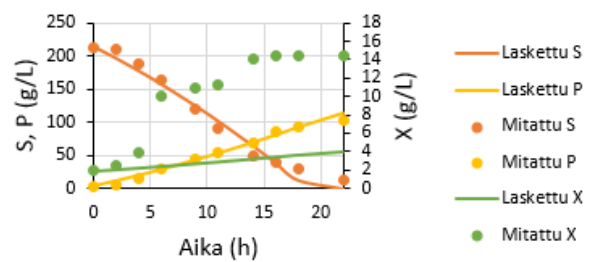
Jerusalimskyn tuoteinhibitiomalli,  
Data 2



Ghosen ja Tyagin tuoteinhibitiomalli,  
Data 1



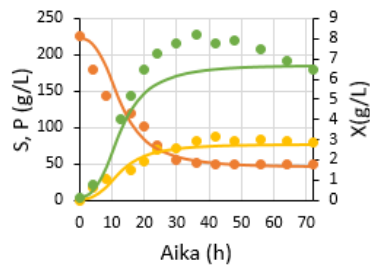
Ghosen ja Tyagin tuoteinhibitiomalli,  
Data 2



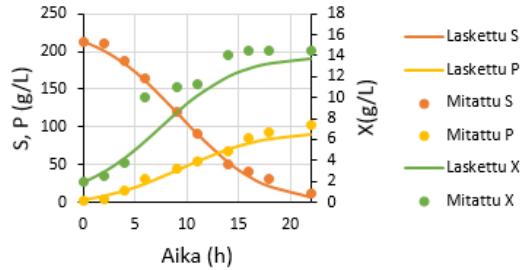
Kuva 27. Hinshelwoodin, Jerusalemskyn, sekä Ghosen ja Tyagin tuoteinhibitiomallien sovitukset datoihin 1 ja 2.

Kuvasta (27) havaitaan, että Hinshelwoodin ja Jerusalemskyn mallit soveltuvat kohtuullisella tarkkuudella dataan 2, mutta biomassakonsentraation osalta sovitukset on heikko datan 1 osalta. Ghosen ja Tyagin mallin sovitukset on biomassan osalta huomattavan epätarkkoja sekä dataan 1 että dataan 2 sovitettaessa.

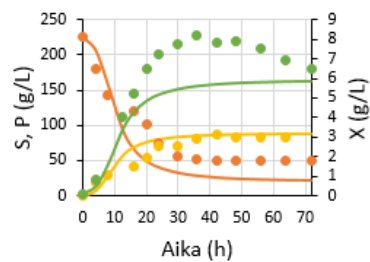
Levenspielin tuoteinhibitiomalli,  
Data 1



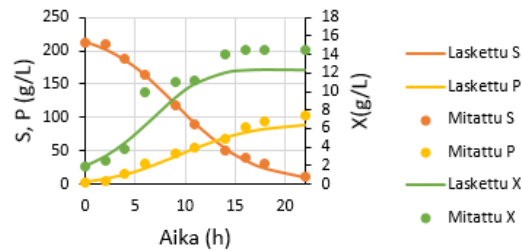
Levenspielin tuoteinhibitiomalli,  
Data 2



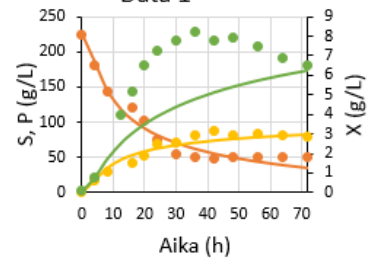
Luongin tuoteinhibitiomalli,  
Data 1



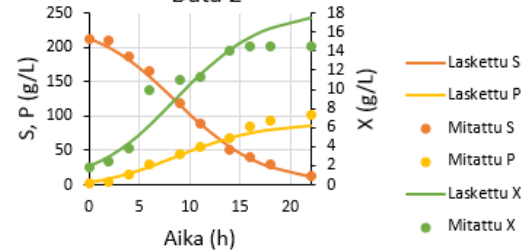
Luongin tuoteinhibitiomalli,  
Data 2



Aiban tuoteinhibitiomalli,  
Data 1



Aiban tuoteinhibitiomalli,  
Data 2



Kuva 28. Levenspielin, Luongin ja Aiban tuoteinhibitiomallien sovitus datoihin 1 ja 2.

Kuvasta (28) havaitaan, että Levenspielin, Luongin ja Aiban tuoteinhibitiomallit sovittuvat kohtuullisella tarkkuudella kaikkien komponenttien pitoisuuskäyrien osalta datoihin 1 ja 2. Käyrien sovittuminen on tarkempaa dataan 2 kuin dataan 1 sovitettaessa. Kuvien tarkastelun perusteella tarkemman analyysin kohteeksi valitaan Levenspielin, Luongin ja Aiban tuoteinhibitiomallit.

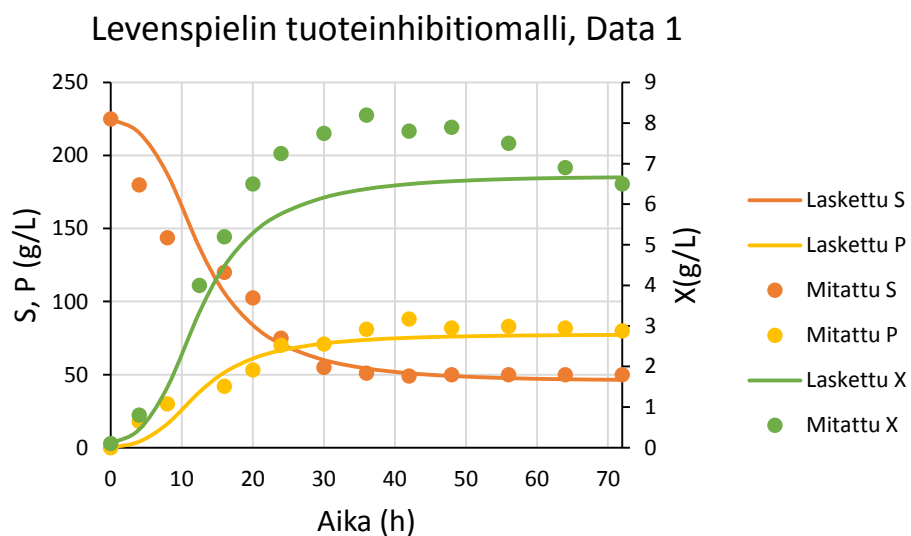
### 8.6.6 Mallien vertailu

Graafisessa tarkastelussa havaittiin käytettyjen datojen kuvaamiseen parhaiten soveltuviksi malleiksi lopputuoteinhibitiomalleihin kuuluvat Levenspielin, Luongin ja

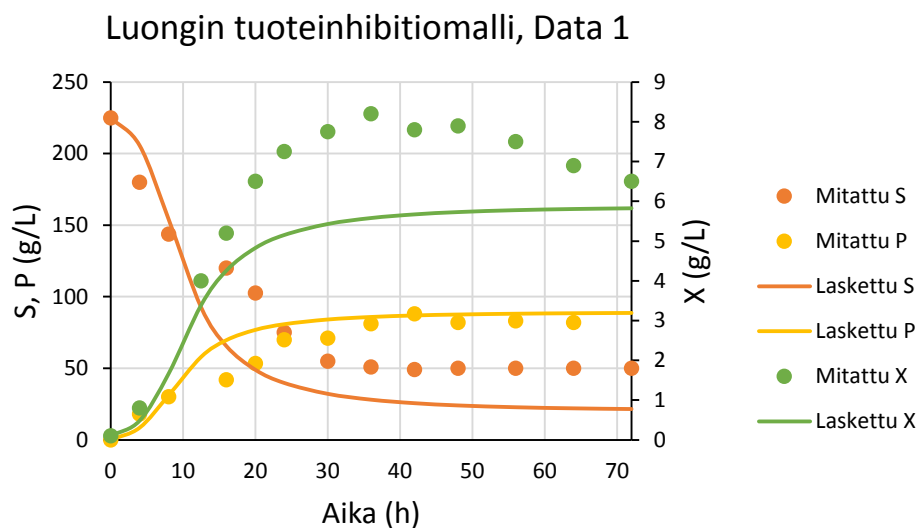
Aiban mallit. Näiden mallien luotettavuutta vertaillaan seuraavaksi suhteellisten erojen, painotettujen neliösummien ja korrelaatiomatriisien avulla. Malleille sovitettujen parametrien arvot on esitetty liitteessä 3 taulukossa 1.

Kuten taulukosta 1 on havaittavissa, saman mallin parametrit saavat eri arvot eri dataa käytettäessä. Tämä havaittiin myös simulointien aikana, kun samoja arvoja kokeiltaessa sovitukset ei konvergoineet. Erot parametrien arvoissa voivat olla seurausta erisuurista biomassan ja substraatin alkupitoisuuksista, joiden vuoksi hiivan spesifinen kasvunopeus ja etanolin spesifinen tuotantonopeus ovat molemmissa mittauksissa erisuuret. Näin ollen myös muut parametrien arvot voivat erota toisistaan kahdessa fermentointidatassa.

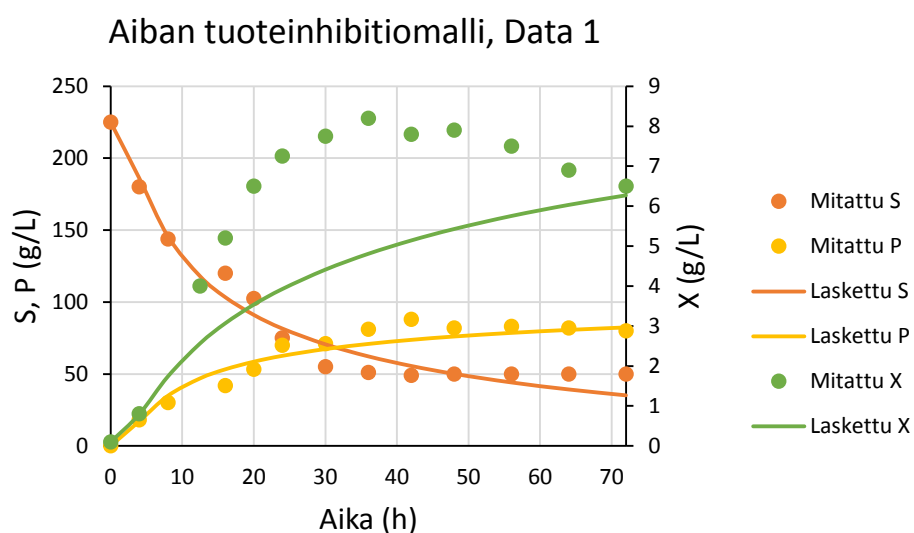
Levenspielin lopputuoteinhibitiomallin sovitukset dataan 1 on esitetty kuvassa (29), Luongin kuvassa (30) ja Aiban kuvassa (31).



Kuva 29. Levenspielin lopputuoteinhibitiomallin (yhtälöt 71 ja 72) sovitukset dataan 1.



Kuva 30. Luongin lopputuoteinhibitiomallin (yhtälöt 73 ja 74) sovitus dataan 1.



Kuva 31. Aiban lopputuoteinhibitiomallin (yhtälöt 63 ja 64) sovitus dataan 1.

Kuvien (29...31) perusteella dataan 1 sovitettaessa Levenspielin malli sovituu muita malleja paremmin substraattikulutuksen, biomassan kasvun ja etanolinmuodostuksen kuvaamiseen. Levenspielin mallilla on mahdollista kuvata fermentoinnin lopetuspisteen pitoisuudet tarkemmin kuin muilla malleilla. Silmämääräisesti merkittävin epätarkkuus Luongin ja Aiban malleissa liittyy biomassan kasvun kuvaamiseen. Luongin mallilla saavutetaan parempi sovitus biomassan kasvussa kuin

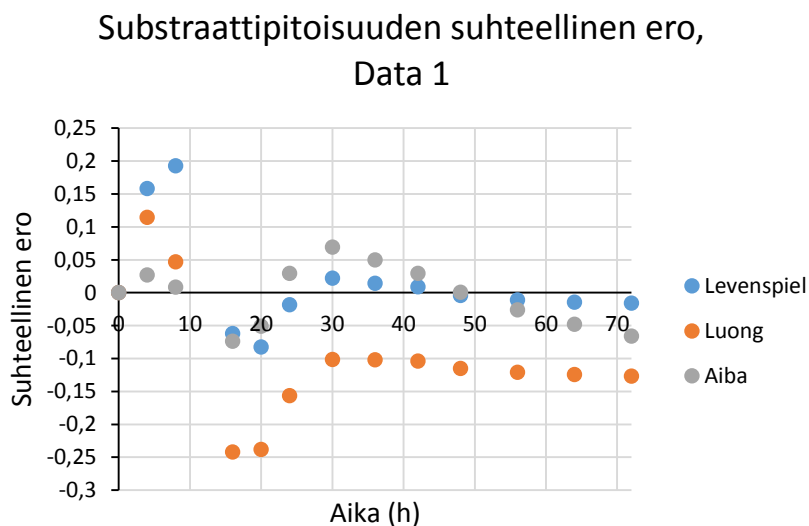
Aiban mallilla, mutta Aiban malli ennustaa jokseenkin paremmin substraatin kulutusta, ja biomassan loppupitoisuus saavutetaan tarkemmin Aiban kuin Luongin mallissa.

Mallien suhteelliset erot kunkin komponentin pitoisuudelle voidaan määrittää mallin avulla laskettujen arvojen ja mitattujen arvojen erotuksen ja mittauksen maksimiarvon suhteena yhtälöllä 105.

$$\text{Suhteellinen ero} = \frac{\text{Mallin ennuste} - \text{Mittauspiste}}{\text{Mittauksen maksimiarvo}} \quad (105)$$

Kun suhteellisen eron vertailukohtana on mittauspistejoukon maksimiarvo, voidaan virheen merkittävyyttä eri ajanhetkillä verrata toisiinsa.

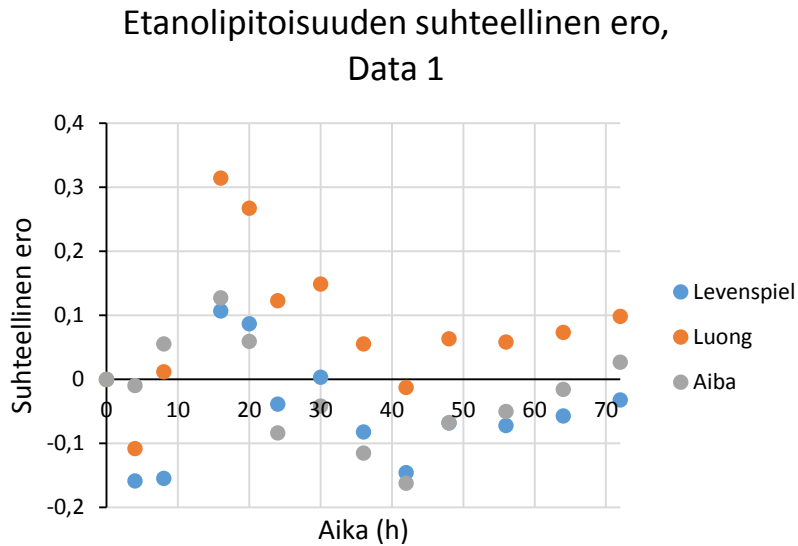
Mallien suhteelliset erot mallin antaman ennusteen ja mittausdatan välillä on esitetty substraattipitoisuudelle kuvassa (32), etanolipitoisuudelle kuvassa (33) ja biomassapitoisuudelle kuvassa (34).



Kuva 32. Substraattipitoisuuksien suhteelliset erot maksimipitoisuuteen suhteutettuina dataan 1 sovitettuina Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille.

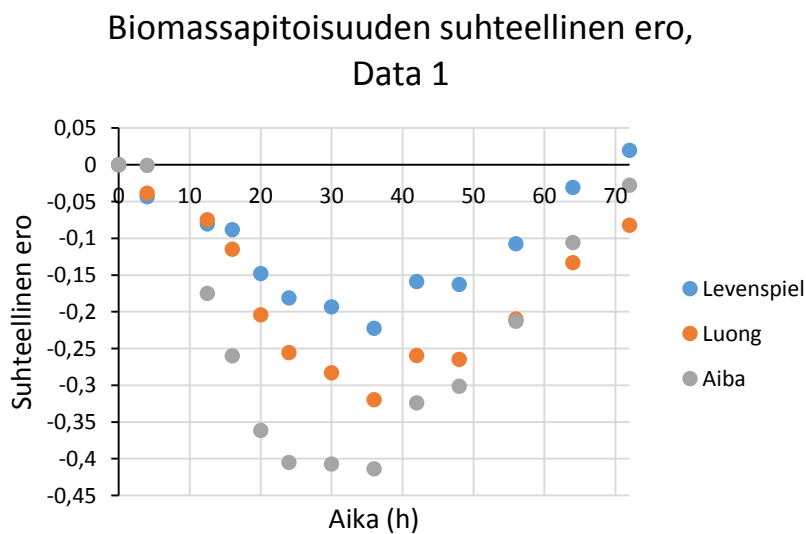
Kuvan (32) perusteella merkittävin ero substraattipitoisuudessa esiintyy koko fermentoinnin ajan Luongin mallin sovituksessa. Levenspielin ja Aiban mallien sovituksissa erot ovat lähes kauttaaltaan yhtä merkittäviä. Alussa Levenspielin mallin ero on merkit-

tävämpi, mutta keskivaiheessa ja lopussa Aiban mallilla lasketut pisteet eroavat enemmän mittaesarvoista. Näin ollen paras sovitus substraattipitoisuuden suhteen saavutetaan Levenspielin mallilla.



Kuva 33. Etanolipitoisuuksien suhteelliset erot maksimipitoisuuteen suhteutettuina dataan 1 sovitettuina Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille.

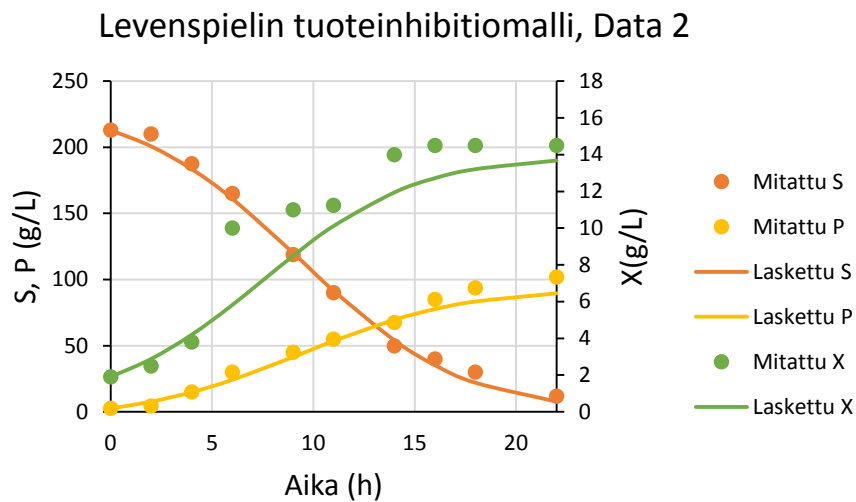
Kuvan (33) perusteella merkittävin ero etanolipitoisuuskäyrien sovituksessa on Luongin mallissa. Levenspielin ja Aiban malleissa suhteelliset erot ovat lähellä toisiaan.



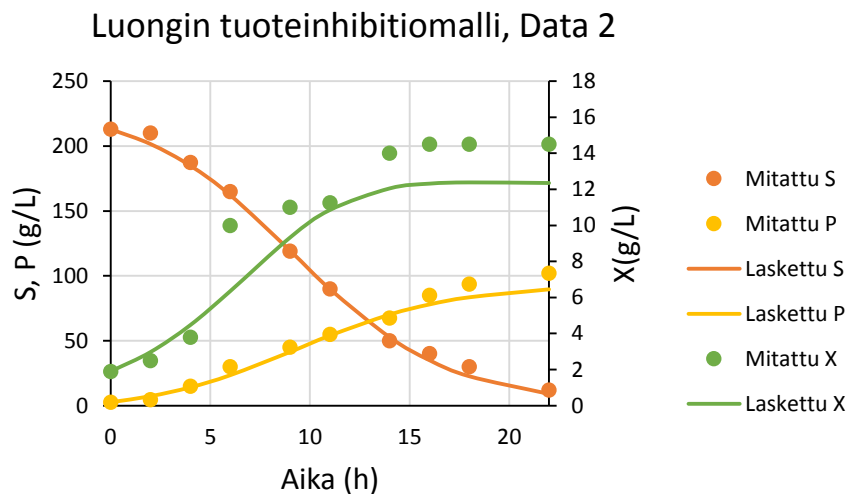
Kuva 34. Biomassapitoisuuksien suhteelliset erot maksimipitoisuuteen suhteutettuina dataan 1 sovitettuina Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille.

Kuvan (34) mukaan biomassapitoisuuden sovituksessa merkittävin ero on Aiban mallissa. Paras sovitus saavutetaan Levenspielin mallilla. Kun tarkastellaan mallien tarkkuutta kaikkien komponenttien pitoisuuskäyrien kuvaamisessa, Levenspielin mallilla saavutetaan paras sovitus datan 1 kohdalla.

Levenspielin tuoteinhibitiomallin sovitus dataan 2 on esitetty kuvassa (35), Luongin kuvassa (36) ja Aiban kuvassa (37).

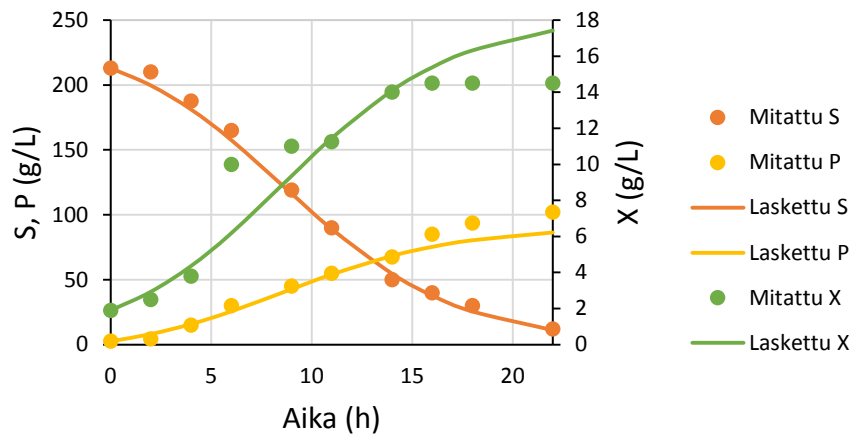


Kuva 35. Levenspielin lopputuoteinhibitiomallin (yhtälöt 71 ja 72) sovitus dataan 2.



Kuva 36. Luongin lopputuoteinhibitiomallin (yhtälöt 73 ja 74) sovitus dataan 2.

### Aiban tuoteinhibitiomalli, Data 2

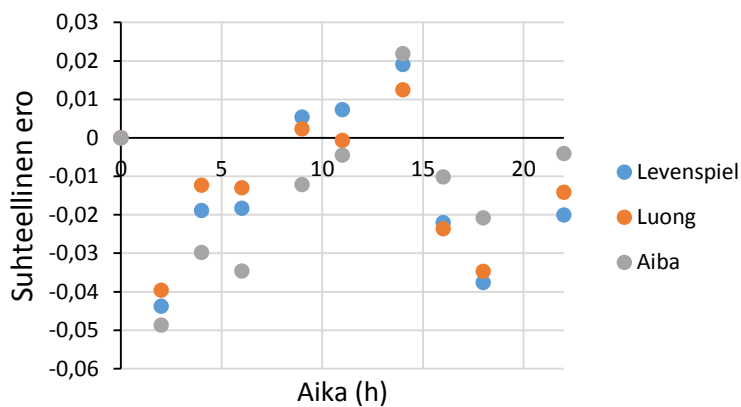


Kuva 37. Aiban lopputuoteinhibitiomallin (yhtälöt 63 ja 64) sovitus dataan 2.

Kuvien (35...37) vertailun perusteella tarkimmin oikeat loppupitoisuudet saavutetaan Levenspielin mallilla. Muutoin sovitus tarkkuudet ovat graafisesti vertaillen yhtä hyviä.

Mallien suhteelliset erot mallin antaman ennusteen ja mittausdatan välillä substraatti-, etanoli- ja biomassapitoisuuksille dataan 2 sovitettaessa on esitetty kuvissa (38...40).

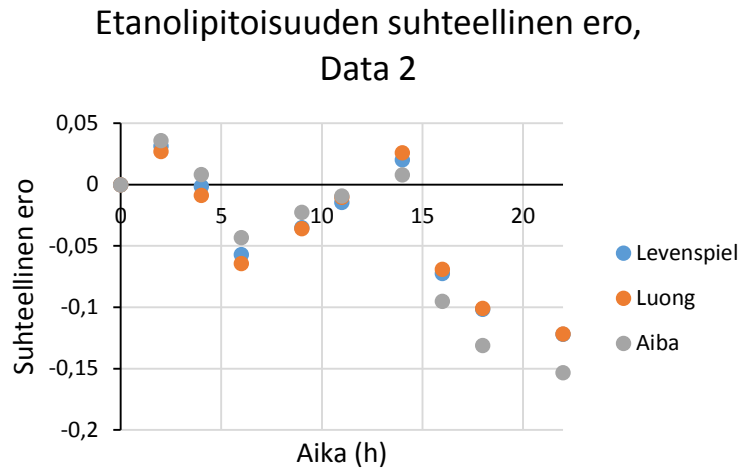
### Substraattipitoisuuden suhteellinen ero, Data 2



Kuva 38. Substraattipitoisuuksien suhteelliset erot maksimipitoisuuteen suhteutettuina dataan 2 sovitettuina Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille.

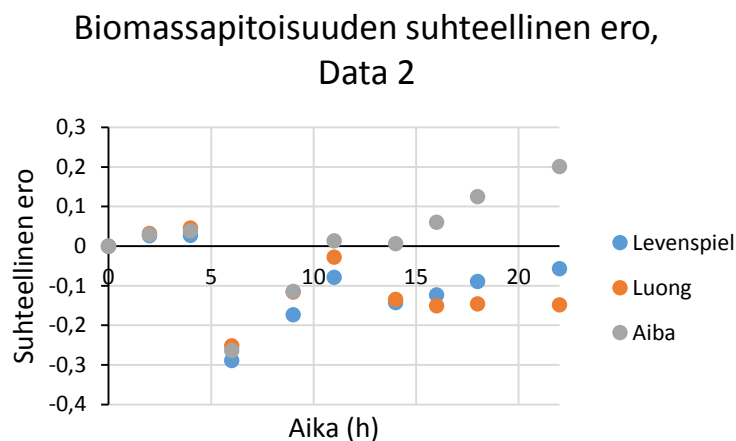


Kuvan (38) perusteella substraattipitoisuuskäyrän sovituksessa merkittävin ero on ennen fermentoinnin puoliväliä Aiban mallissa. Paras sovitus saavutetaan Luongin mallilla koko fermentoinnin ajan.



Kuva 39. Etanolipitoisuuksien suhteelliset erot maksimipitoisuuteen suhteutettuina dataan 2 sovitettuina Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille.

Kuvan (39) perusteella ennen fermentoinnin puoliväliä sovitusvirheet ovat lähellä toisiaan. Fermentoinnin puolivälin jälkeen merkittävin virhe on Aiban mallin sovituksessa. Pienin virhe saavutetaan Luongin mallilla koko fermentoinnin ajan.



Kuva 40. Biomassapitoisuuksien suhteelliset erot maksimipitoisuuteen suhteutettuina dataan 2 sovitettuina Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille.

Kuvasta (40) havaitaan, että fermentoinnin alussa mallien suhteelliset virheet ovat lähellä toisiaan. Fermentoinnin puolivälin jälkeen virheet alkavat kasvaa ja Levenspielin mallilla saavutetaan muita malleja tarkempi sovitus.

Kun tarkastellaan kaikkien komponenttien pitoisuuskäyrien sovittumista kokonaisuutena, paras sovitus saavutetaan Luongin mallilla. Heikoin sovitus saavutetaan Aiban mallilla. Kuitenkin erot mallien välillä ovat datan 2 kohdalla vähäisiä.

Mallin antaman ennusteen ja mittauspisteen välisten erotusten neliösummat kuvaavat numeerisesti samoja asioita, jotka voidaan päätellä graafisesti pitoisuuskäyrien ja suhteellisten erojen perusteella. Kolmen tarkastellun mallin sovitus neliösummat molemmilla kirjallisuusdatoilla sovitettaessa, kun neliösumma on jaettu mittauspisteiden lukumäärällä, on esitetty taulukossa (9).

Taulukko 9. Levenspielin, Luongin ja Aiban lopputuoteinhibitomallien sovitus kohdefunktion arvot (mittauspisteiden ja mallin ennusteiden erotusten neliösummat) datoilla 1 ja 2, kun summat on jaettu datapisteiden lukumäärällä.

Malli	Neliösumma	
	Data 1	Data 2
Levenspiel	166	33
Luong	514	30
Aiba	70	42

Taulukossa (9) esitettyjen neliösummien perusteella kaikilla malleilla sovitus dataan 2 on tarkempi kuin sovitus dataan 1. Dataan 1 sovitettaessa Aiban mallilla saavutetaan merkittävästi muita malleja pienempi virhe. Dataan 2 sovitettaessa erot virheiden suuruuksissa ovat pienemmät, ja tällöin Luongin mallin sovituksessa saavutetaan pienin neliösumma. Neliösummien perusteella voidaan tehdä mallien tarkkuudesta samat päätelmät kuin pitoisuuskäyrien ja suhteellisten virheiden graafisella tarkastelulla, mutta graafisen kuvauksen perusteella on mahdollista tarkkailla sovituksen tarkkuutta ajan funktiona.

Sovituksen luotettavuuteen vaikuttaa, kuinka hyvin parametrit identifioituvat. Parametrien identifioitumista voidaan tarkastella korrelaatiomatriisin avulla. Kun korrelaatiokertoimen arvo matriisin solussa on 1, kahden parametrin välillä vallitsee vahva lineaarinen riippuvuus. Kun korrelaatiokertoimen arvo on -1, kahden parametrin välillä vallitsee vahvan käänteinen lineaarinen korrelaatio. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on lukua -1 tai 1, sitä vahvempi riippuvuus parametrien välillä vallitsee. Tällöin parametrien identifioituminen on heikkoa. Identifioituminen on sitä täydellisempi, mitä lähempänä nollaa korrelaatiokertoimen arvo on.

Fermentoinnin kineettisten mallien parametrien välillä voi todellisuudessa vallita riippuvuuksia, jolloin parametrien välisten todellisten korrelaatiokertoimien arvot voivat olla lähempänä arvoa 1 kuin 0. Tässä työssä simulointimallissa ei ole huomioitu tällaisia riippuvuuksia, minkä vuoksi tulosten tarkastelussa oletetaan, että hyvin identifioituvat parametrit ovat toisistaan riippumattomia.

Korrelaatiomatriisit Levenspielin, Luongin ja Aiban mallien datojen 1 ja 2 mukaan sovitetuille parametreille on esitetty liitteen 4 taulukoissa (1...6). Korrelaatiomatriiseja tarkasteltaessa havaitaan, että molempiin datoihin sovitettaessa kaikilla kolmella mallilla joidenkin parametrien välillä on vahvoja lineaarisia ja vahvoja käänteisesti lineaarisia korrelaatioita. Yhdenkään mallin sovituksessa ei ole saavutettu ratkaisua, jossa kaikki korrelaatiokertoimet olisivat suhteellisen lähellä nollaa. Korrelaatiomatriisien tarkastelun perusteella ei voida asettaa mallien sovituksen luotettavuutta paremmuusjärjestykseen. Korrelaatiomatriiseja tarkasteltaessa huomataan myös, että parametrien täydelliset lineaariset tai käänteiset lineaariset korrelaatiot esiintyvät datoissa 1 ja 2 saman mallin eri parametrien väleillä. Näin ollen korrelaatiomatriisien perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä mallien parametrien välisistä riippuvuussuhteista.

## **8.7 Virhearviointi**

Kuten aikaisemmin tässä luvussa simulointituloksia analysoitaessa on havaittu, jokaisen mallin kohdalla käyrän sovituksen liittyy huomattavia virheitä. Mallien epätäydellistä sovittumista datajoukkoihin voidaan selittää mallien soveltumattomuuden lisäksi simulointimallissa tehdyillä oletuksilla sekä mittausdatan sisältämillä virheillä.

Kuten luvussa 8.5. on todettu, mittausdatassa ei ole tietoa sivutuotteiden pitoisuuksista, minkä vuoksi datan pohjalta muodostettava massatase ei täsmää. Aspen kuitenkin ratkaisee systeemin siten, että massatase toteutuu. Näin ollen datan ja mallinnustulosten välille syntyy eroavaisuuksia. Eroavaisuuksien syntyyn vaikuttaa myös se, että simulointimallissa hiilidioksidia on oletettu muodostuvan jatkuvasti samalla nopeudella kuin etanolia, mikä ei todellisuudessa päde koko fermentoinnin ajan.

Mittausdata on kerätty kuvaajista taulukoihin manuaalisesti, minkä vuoksi simuloinneissa käytetyssä datassa esiintyy kuvaajien lukemiseen liittyvää inhimillistä epätarkkuutta. Simuloitaessa mittausdatapisteiden keskihajonnaksi on oletettu 1 g/L, mikä ei välttämättä vastaa todellisuutta jokaisessa pisteessä.

Hiivaa kuvataan muodostetussa simulointimallissa pseudokomponenttina, jolla on glukoosin rakennekaava ja aineominaisuudet. Mittauksissa substraattina on käytetty ruokosokerimelassiliuosta, joka sisältää glukoosin lisäksi muita fermentoituvia sokereita. Reaalimaailmassa hiivan massaa kasvattavat sokerin lisäksi ammoniakki ja muut ravinteet. Näiden seikkojen vuoksi simulointimallissa käytetty hiivan muodostumisen stoikiometria ei vastaa täysin datan kuvaamaa hiivan todellista kasvua. Hiiva tuottaa kasvaessaan pienen määrän vettä, jota ei ole simulointimallissa huomioitu.

Datan epätarkkuuden ja rajallisen määrän vuoksi parametrien sovittamisessa päädytään tilanteeseen, jossa parametreille on olemassa useita erilaisia ratkaisukombinaatioita, joihin laskenta konvergoi. Kaikilla konvergoituneilla ratkaisuilla ei kuitenkaan saavuteta mittausdataa vastaavia fermentoinnin pitoisuusprofiileja ajan suhteen. Näin ollen mallin sovituksen onnistumiseksi on löydettävä parametreille alkuarvaukset, jotka ovat lähimpänä sitä ratkaisua, jolla käyrän muoto sovittuu oikein. Malleja sovitettaessa ei voida varmuudella sanoa, että löydetty ratkaisu on sovituksen kannalta optimaalinen, vaan on olemassa mahdollisuus vielä tarkemman sovituksen saavuttamiselle.

Todellisuudessa fermentoinnin kineettisten mallien parametrien välillä voi vallita fysiikaalisia riippuvuuksia. Näitä riippuvuuksia ei ole huomioitu simulointimallissa, vaan kaikki parametrit on sovitettu toisistaan riippumattomina. Tämä voi olla syynä tuloksissa esiintyville mallien epätarkkuuksille.

## 9 Johtopäätökset ja jatkotutkimusehdotukset

Tässä työssä on löydetty kolme kineettistä mallia, Levenspielin, Luongin ja Aiban mallit, joilla on mahdollista kuvata kahden erilaisen mittausdatan (Data 1 ja Data 2) mukaista hiivan kasvua, etanolituotantoa ja substraatinkulutusta. Malleilla tehtyjä sovituksia tarkasteltaessa on havaittu, että sovitukset sisältävät epätarkkuuksia. Epätarkkuudet johtuvat mallin sisäisen epätarkkuuden lisäksi olennaisesti puutteellisesta mittausdatasta ja prosessisimuloinnissa tehdyistä oletuksista.

Sovituksen tarkkuuden parantamiseksi on oltava saatavilla mittausdataa, joka huomioi biomassan, substraatin ja etanolin pitoisuuksien lisäksi fermentoinnissa syntyvien sivutuotteiden ja hiilidioksidin määrän. Kun tavoitteena on kehittää kineettinen malli lignoselluloosapohjaista raaka-ainetta käyttävään etanolifermentointiprosessiin, tulee mittausdatan sisältää edellä mainittujen lisäksi muiden lignoselluloosahydrolysaatin sisältämien komponenttien pitoisuudet. Mahdollisimman suurta tarkkuutta tavoiteltaessa huomioidaan myös ravinnekomponenttien pitoisuudet.

Fermentoinnissa syntyvän hiilidioksidin määrää voidaan arvioida muodostuvan etanolin määrästä. Kuitenkin hiilidioksidin ja etanolin muodostumisnopeuksien suhteet voivat muuttua prosessin ajan aikana. Myöskään sivutuotteiden muodostuminen ei seuraa etanolin muodostusta suoraan, vaan sivutuotteiden ja etanolin määrien suhde muuttuu jatkuvasti fermentoinnin aikana. Tämän vuoksi tarkemman mallin luomiseksi tulisi hiilidioksidin ja sivutuotteiden muodostuminen mallintaa erillisillä kineettisillä malleilla mittausdataan sovitettuna.

Tässä työssä muodostetussa simulointimallissa on oletettu, että hiiva saa jatkuvasti riittävästi ravinteita ja happea kasvuun ja etanolintuotantoon. Esimerkiksi typen määrä kuitenkin vaikuttaa huomattavasti hiivan kykyyn kasvaa ja tuottaa etanolia. Näin ollen tarkemman mallin muodostamiseksi tulisi myös ammoniakin tai muun typpilähteen määrä huomioida. Ammoniakin ohella hiivan kasvua ja fermentointia säätelee liuenneen hapen määrä, jonka vaikutus on kattavassa fermentointimallissa huomioitava. (Nielsen *et al.*, 2003, luku 7) Typen lisäksi hiiva kuluttaa kasvuunsa muita ravinteita, kuten fosforia ja rikkiä, jotka esiintyvät myös hiivan rakennekaavassa. Tarkan mallin

luomiseksi myös nämä rakennekomponentit olisi huomioitava simulointimallissa siten, että hiivan kasvun reaktioyhtälö sisältää substraatin lisäksi typen ja muut ravinteet. Edellä mainittujen seikkojen huomioimiseksi hiiva tulisi mallintaa pseudokomponenttilla, joka sisältää hiilen, vedyn ja hapen lisäksi kaikki ravinnekomponentit.

Malleja vertailtaessa on otettava huomioon, että tässä työssä sovitus on suoritettu ainoastaan kahden datajoukon avulla. Mittausdatan funktionaalisesta muodosta riippuen eri mallit soveltuvat parhaiten kuvaamaan kunkin datan mukaista fermentointiprosessia. Näin ollen luotettavan vertailun suorittamiseksi vaaditaan useita erimuotoisia datajoukkoja, joissa kasvun vaiheiden pituudet vaihtelevat ja mm. komponenttien alkukonsentraatioita varioidaan.

Hiivan aineenvaihdunnan toiminta riippuu voimakkaasti lämpötilasta. Tämän vuoksi myös fermentoinnin parametrien arvot riippuvat lämpötilasta. Jotta on mahdollista simuloida fermentointia eri prosessiolosuhteissa, on kokeellista mittausdataa tuotettava eri olosuhteissa ja optimoitava parametrit jokaiselle datajoukolle erikseen. Lämpötilan tavoin myös substraatin eri alkupitoisuuksille ja kasvuliuksen eri pH-olosuhteille vaaditaan omaa mittausdataa.

Substraatin alkupitoisuuden lisäksi substraatin tyyppi vaikuttaa fermentoinnin etene- miseen ja tuotteiden loppupitoisuuksiin. Tässä työssä substraatti on kuvattu glukoo- sina. Kuitenkin substraatti on fermentoinnissa usein erilaisten sokereiden seos. Tämä pätee esimerkiksi lignoselluloosahydrolysaatin tapauksessa. Lignoselluloosahydroly- saatti sisältää myös hiivakäymiseen soveltumattomia sokereita, joiden läsnäolo liuk- sessa voi vaikuttaa hiivan toimintaan. Kun hiiva siirtyy metaboliassaan kuluttamaan yhden sokerityypin jälkeen seuraavaa, kasvussa esiintyy viipymävaihe. Näin ollen katta- van mallin muodostamiseksi myös substraattina toimivan sokerin tyyppi, substraatin vaihtuminen sokerityypistä toiseen, sekä hiivakäymiseen soveltumattomien sokereiden vaikutus hiivan toimintaan on huomioitava. (Wang *et al.*, 2004)

Tässä työssä käsitellyissä kineettisissä malleissa inhibition vaikutus sisältyy datan perusteella sovitettujen parametrien arvoihin, eikä etanolin ja substraatin lisäksi muiden inhibitoristen komponenttien pitoisuutta ole sisällytetty kineettisiin lausek- keisiin. Näin ollen tässä työssä esiteltyjä malleja käytettäessä inhiboivien komponent-

tien vaikutuksen huomiointi tapahtuu sovittamalla mallit sellaisista mittauksista kerättyyn dataan, joissa tiedetään esiintyvän tietyn tyyppisiä inhibiittoreita, esimerkiksi heikkoja happoja. Tarkemman mallin luomiseksi on kineettiseen malliin lisättävä termi, joka sisältää systeemissä esiintyvien inhibiittoreiden, kuten heikkojen happojen konsentraatiot.

Hiivan kasvunopeus ja etanolin muodostumisnopeus vaihtelevat hiivan eri kasvuvaiheissa. Tuotettaessa mittausdataa fermentoinnin kineettisen mallin sovittamiseksi on huomioitava, että dataa on kerätty riittävästi jokaisessa kasvun vaiheessa mahdollisimman tarkan, luotettavan ja ennustuskykyisen mallin luomiseksi.

Tässä työssä tutkittujen mallien sovituksessa mahdollisia todellisia parametrien välisiä riippuvuuksia ei ole huomioitu, vaan kaikki parametrit on sovitettu matemaattisesti siten, että ne ovat toisistaan riippumattomia. Todellisuudessa jotkin parametrit voivat riippua toisistaan. Esimerkiksi saturaatiovakioiden arvot voivat riippua spesifisistä kasvu- ja tuotantonopeuksista. Fermentoinnin simulointimallin jatkokehittelyssä tulisi huomioida parametrien väliset riippuvudet todellisuutta mahdollisimman tarkasti kuvaavan mallin luomiseksi. Kaikkien mallien kohdalla parametrien välisiä todellisia riippuvuuksia on haastavaa arvioida, sillä kirjallisuudesta ei ole saatavilla tarkkaa analyysia parametrien välisistä korrelaatioista.

Tässä työssä kaasu- ja nestefaasien erottaminen on mallinnettu erillään fermentoinnista. Tarkemmin todellista fermentointiprosessia kuvaavassa simulointimallissa hiilidioksidia poistetaan fermentorista jatkuvasti myös panosfermentoinnin aikana. Jatkuvoimisen fermentoinnin mallinnuksessa otetaan huomioon fermentointiliuoksen takaisinkierrätys.

Fermentoinnin mallinnuksen tarkkuuteen vaikuttaa datan keräykseen, kineettiseen malliin ja simuloitavan prosessin malliin liittyvien seikkojen muodostama kokonaisuus. Näitä seikkoja on esitetty taulukossa (10).

Taulukko 10. Fermentoinnin simulointimallin rakentamisessa huomioitavia asioita datan tuottamisen, kineettisen mallin luomisen ja prosessimallin luomisen kannalta.

<b>Fermentoinnin simulointimallin rakentamisessa huomioitavaa</b>		
<b>Datan tuottaminen</b>	<b>Kineettinen malli</b>	<b>prosessimalli</b>
Datassa oltava mukana kaikkien komponenttien pitoisuudet: substraattien, biomassan, etanolin ja sivutuotteiden, sekä ravinteiden ja lignoselluloosan sisältämien komponenttien pitoisuudet.	Oma malli jokaiselle fermentoinnin aikana kuluvalle tai muodostuvalle komponentille: substraatille, hiivalle, etanolille, hiilidioksidille, sivutuotteille ja ravinteille.	Hiivan mallintaminen pseudokomponentilla, jossa mukana hiilen, vedyn ja hapen lisäksi typpi ja muut ravinnekomponentit.
Dataa eri olosuhteista, joissa vaihdeltu mm. komponenttien alkupitoisuuksia, lämpötilaa, painetta ja pH:ta, sekä käytetty erilaisia substraatteja.	Erillinen inhibitiotermi, jossa on huomioitu inhibiittorien, kuten heikkojen happojen pitoisuudet.	Simulointi eri ajotavoilla: panos-, panossyöttö- ja jatkuvatoiminen prosessi.
Datassa huomioituina eri kasvunvaiheet.	Parametrien riippuvuudet toisistaan.	Hiilidioksidin poisto samassa yksikössä fermentoinnin kanssa.
Dataa eri ajotavoilla mitattuna: panos-, panossyöttö- ja jatkuvatoiminen prosessi.	Eri substraattityyppien vaiheittainen kulutus.	Eri substraattityyppien vaiheittainen kulutus.
Riittävästi toistokokeita keskihajonnan määrittämiseksi.		
Liuenneen hapen määrän vaikutuksen huomioiminen.		



## Viitteet

- Aittomäki, E., Eerikäinen, E., Leisola, M., Ojamo, H., Suominen, I., von Weymarn, N., *Bioprosessitekniikka*, 1. painos, WS Bookwell Oy, Porvoo 2002, 445 s.
- Aldiguier, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribe Larrea, J. L., Guillouet, S. E., ja Molina-Jouve, C., Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **26** (2004) 217-222.
- Alén, R., Structure and chemical composition of wood, Teoksessa *Papermaking Science and Technology*, toim. P. Stenius, Fapet Oy, Helsinki 2000, ss. 37-98.
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G. ja Gorwa-Grauslund, M. F., Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82** (2007) 340-349.
- Amillastre, E., Aceves-Lara, C. A., Uribe Larrea, J. L., Alfenore, S., ja Guillouet, S. E., Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.* **117** (2012) 242-250.
- Amorim, H. V., Lopes, M. L., de Castro Oliveira, J. V., Buckeridge, M. S. ja Goldman, G. H., Scientific challenges of bioethanol production in Brazil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91** (2011) 1267-1275.
- Anonyymi a, *Aspen Plus User Models* V8.6, Aspen Technology, Burlington 2014, 360 s.
- Bafrncova, P., Sláviková, I., Pátková, J. ja Dömény, Z., Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.* **21** (1999) 337-341.
- Bai, F. W., Chen, L. J., Anderson, W. A. ja Moo-Young, M., Parameter oscillations in a very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on a multistage packed column bioreactor system, *Biotechnol. Bioeng.* **88** (2004) 558-566.

Bai, F. W., Anderson, W. A., ja Moo-Young, M., Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 89-105.

Bailey, J. E. ja Ollis, D. F., *Biochemical engineering fundamentals*, 2. painos, McGraw-Hill Book Company, Singapore 1986, 984 s.

Benaroudj, N., Lee, D. H., & Goldberg, A. L., Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 24261-24267.

Birol, G., Doruker, P., Kirdar, B., Önsan, Z. İ., ja Ülgen, K., Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochem.* **33** (1998) 763-771.

Boer, V. M., de Winde, J. H., Pronk, J. T., ja Piper, M. D., The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 3265-3274.

Borovikova, D., Scherbaka, R., Patmalnieks, A. ja Rapoport, A., Effects of yeast immobilization on bioethanol production, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **61** (2014) 33-39.

Cruz, A. L. B., Verbon, A. J., Geurink, L. J., Verheijen, P. J. T., Heijnen, J. J. ja Van Gulik, W. M., Use of sequential-batch fermentations to characterize the impact of mild hypothermic temperatures on the anaerobic stoichiometry and kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* **109** (2012) 1735-1744.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., ja Piškur, J., Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res* **14** (2014) 826-832.

de Andrade, R. R., Maugeri Filho, F., Maciel Filho, R. ja da Costa, A. C., Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle, *Bioresour. Technol.* **130** (2013) 351-359.

Días, M. O. S., Junqueira, T. L., Jesus, C. D. F., Rossell, C. E. V., Maciel Filho, R., ja Bonomi, A., Improving bioethanol production—comparison between extractive and low temperature fermentation, *appl energy* **98** (2012) 548-555.

Díaz-Montaño, D. M., Continuous Agave Juice Fermentation for Producing Bioethanol, *Biomass Now: Sustainable Growth and Use*, toim. Matovic, M. D., Rijeka Croatia 2013, ss. 209-230.

Dodić, J. M., Vučurović, D. G., Dodić, S. N., Grahovac, J. A., Popov, S. D., ja Nedeljković, N. M., Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice, *Appl Energ* **99** (2012) 192-197.

Dorta, C., Oliva-Neto, P., de-Abreu-Neto, M. S., Nicolau-Junior, N., ja Nagashima, A. I., Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26), *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22** (2006) 177-182.

El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F. A. , Demain, A. L. ja Allman, A. R., *Fermentation microbiology and biotechnology*, 2. painos, CRC Press, Boca Raton 2007, 544 s.

Faria-Oliveira, F., Ferreira, C., ja Puga, S., Yeast: World's Finest Chef, Teoksessa *Food Industry*, toim. Muzzalupo, I. Rijeka, Croatia 2013, ss. 519-547.

Flikweert, M. T., *Physiological roles of pyruvate decarboxylase in saccharomyces cerevisiae*, Väitöskirja, Delft University of Technology, Biotechnologian tutkinto-ohjelma, Delft 1999, 145 s.

Fredrickson, A. G., Formulation of structured growth models, *Biotechnol. Bioeng.* **67** (2000) 720-725.

Garhyan, P., Elnashaie, S. S. E. H., Al-Haddad, S. M., Ibrahim, G., ja Elshishini, S. S., Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol, *Chem. Eng. Sci.* **58** (2003) 1479-1496.

Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D., ja Smart, K. A., Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, *FEMS Microbiol. Rev.* **31** (2007) 535-569.

Gomes, J. ja Menawat, A. S., Estimation of fermentation parameters using partial data, *Biotechnol. Prog.* **8** (1992) 118-125.

Gormely, L. S., *Continuous microbiological leaching of a zinc sulphide concentrate*, Väitöskirja, The University of British Columbia, Kemian tekniikan tutkinto-ohjelma, Vancouver 1968, 206 s.

Graves, T., Narendranath, N., ja Power, R., Development of a "Stress Model" fermentation system for fuel ethanol yeast strains, *J. Inst. Brew.* **113** (2007) 263-271.

Han, K. ja Levenspiel, O., Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition, *Biotechnol. Bioeng.* **32** (1988) 430-447.

Henson, M. A., Exploiting cellular biology to manufacture high-value products, *IEEE. Contr. Syst. Mag.* **26** (2006) 54-62.( Henson, 2006)

Horovitz, A., & Yifrach, O., On the relationship between the Hill coefficients for steady-state and transient kinetic data: A criterion for concerted transitions in allosteric proteins, *Bull. Math. Biol.* **62** (2000) 241-246.

Hough, J. S., *The Biotechnology of Malting and Brewing*, 1. painos, Cambridge University Press, Cambridge 1985, 168 s.

Jarzębski, A. B., Malinowski, J. J. ja Goma, G., Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations, *Biotechnol. Bioeng.* **34** (1989) 1225-1230.

Jiménez-Islas, D., Páez-Lerma, J., Soto-Cruz, N. O. ja Gracida, J., Modelling of Ethanol Production from Red Beet Juice by *Saccharomyces cerevisiae* under Thermal and Acid Stress Conditions, *Food Technol. Biotech.* **52** (2014) 93-100.

Juvonen, R., Nohynek, L., Storgårds, E., Wirtanen, G., Honkapää, K., Lyijynen, T., Morkkila, M. ja Haikara, A., VTT TIEDOTTEITA, Espoo 2001, 144 s.

Klinke, H. B., Thomsen, A. B. ja Ahring, B. K., Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66** (2004) 10-26.

Kostov, G., Popova, S., Gochev, V., Koprinkova-Hristova, P., Angelov, M. ja Georgieva, A., Modeling of batch alcohol fermentation with free and immobilized yeasts *Saccharomyces cerevisiae* 46 EVD, *Biotechnol. Biotec. Eq.* **26** (2012) 3021-3030.

- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., ja Stroeve, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48** (2009) 3713-3729.
- Kumar, S., Dheeran, P., Singh, S. P., Mishra, I. M., ja Adhikari, D. K., Kinetic studies of ethanol fermentation using *Kluyveromyces* sp. IIPE453, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88** (2013) 1874-1884.
- Larsen, J., Østergaard Petersen, M., Thirup, L., Wen Li, H. ja Krogh Iversen, F., The IBUS process–lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality, *Chem. Eng. Technol.* **31** (2008) 765-772.
- Leib, T. M., Pereira, C. J. ja Villadsen, J., Bioreactors: a chemical engineering perspective, *Chem. Eng. Sci.* **56** (2001) 5485-5497.
- Lin, Y. ja Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69** (2006) 627-642.
- Liu, Z. ja Li, X., The kinetics of ethanol fermentation based on adsorption processes. *Kem. Ind.* **63** (2014) 259-264.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. ja Clark, D. P., *Biology of Microorganisms*, 12. painos, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco 2009, 1061 s.
- Najafpour, G., Younesi, H. ja Ismail, K. S. K., Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.* **92** (2004) 251-260.
- Narendranath, N. V., Thomas, K. C. ja Ingledew, W. M., Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26** (2001) 171-177.
- Nevado, J., Navarro, M. A. ja Heredia, C. F., Galactose inhibition of the constitutive transport of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **9** (1993) 111-119.
- Nielsen, J., Villadsen, J. ja Lidén, G., *Bioreaction Engineering Principles*, 3. painos, Springer Science+Business Media, New York 2011, 561 s.

Olsson, L. ja Hahn-Hägerdal, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme Microb. Technol.* **18** (1996) 312-331.

Palmqvist, E. ja Hahn-Hägerdal, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresour. Technol.* **74** (2000) 25-33.

Panikov, N. S., Kinetics, microbial growth, Teoksessa *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, toim. Flickinger, M. C., Hoboken New Jersey 1991, ss. 1513-1543.

Paulová, L., Patáková, P., Branská, B., Rychtera, M. ja Melzoch, K., Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency, *Biotechnol. adv.* (2014) DOI 0734-9750.

Phisalaphong, M., Srirattana, N. ja Tanthapanichakoon, W., Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation, *Biochem. Eng. J.* **28** (2006) 36-43.

Ricci, M., Martini, S., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, A. ja Rossi, C., Inhibition effects of ethanol on the kinetics of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modelling study, *Chem. Phys. Lett.* **387** (2004) 377-382.

Rieger, M., Käppeli, O. ja Fiechter, A., The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* **129** (1983) 653-661.

Rivera, E. C., Costa, A. C., Atala, D. I., Maugeri, F., Maciel, M. R. W. ja Maciel Filho, R., Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature, *Process Biochem.* **41** (2006) 1682-1687.

Silljé, H. H. W., Paalman, J. W. G., Ter Schure, E. G., Olsthoorn, S. Q. B., Verkleij, A. J., Boonstra, J. ja Verrips, C. T., Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **181** (1999) 396-400.

- Simpson, D. J. W., Kompala, D. S. ja Meiss, J. D., Discontinuity induced bifurcations in a model of *Saccharomyces cerevisiae*, *Math Biosci* **218** (2009) 40-49.
- Swinnen, E., Wanke, V., Roosen, J., Smets, B., Dubouloz, F., Pedruzzi, I., Cameroni, E., De Virgilio, C. ja Winderickx, J., Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell division* **1** (3) (2006).
- Thomas, K. C., Hynes, S. H. ja Ingledew, W. M., Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids, *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2002) 1616-1623.
- Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M. ja Mas, A., Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. j. food microbiol.* **80** (2003) 47-53.
- Tuite, M. F. ja Oliver, S. G., *Saccharomyces*, 1. painos, Plenum Press, New York 1991, 327 s.
- van Maris, A. J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. ja Pronk, J. T., Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status, *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **90** (2006) 391-418.
- Wachenheim, D. E., Patterson, J. A. ja Ladisch, M. R., Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms, *Bioresour. Technol.* **86** (2003) 157-164.
- Wang, D., Xu, Y., Hu, J. ja Zhao, G., Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Inst. Brew.* **110** (2004) 340-346.
- Wang, L., Zhao, X. Q., Xue, C. ja Bai, F. W., Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation, *Biotechnology for biofuels*, **6** (1) (2013) 1-10.
- Wills, C., Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25** (1990) 245-280.

Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M. ja Pozueta-Romero, J., Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* **34** (2010) 952-985.

Yalcin, S. K. ja Ozbas, Z. Y., Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey, *Braz. J. Microbiol.* **39** (2008) 325-332.

Zacharof, M. P. ja Lovitt, R. W., Modelling and simulation of cell growth dynamics, substrate consumption, and lactic acid production kinetics of *Lactococcus lactis*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **18** (2013) 52-64.

Znad, H., Blažej, M., Bálež, V. ja Markoš, J., A kinetic model for gluconic acid production by *Aspergillus niger*, *Chem. Pap.* **58** (2004) 23-28.



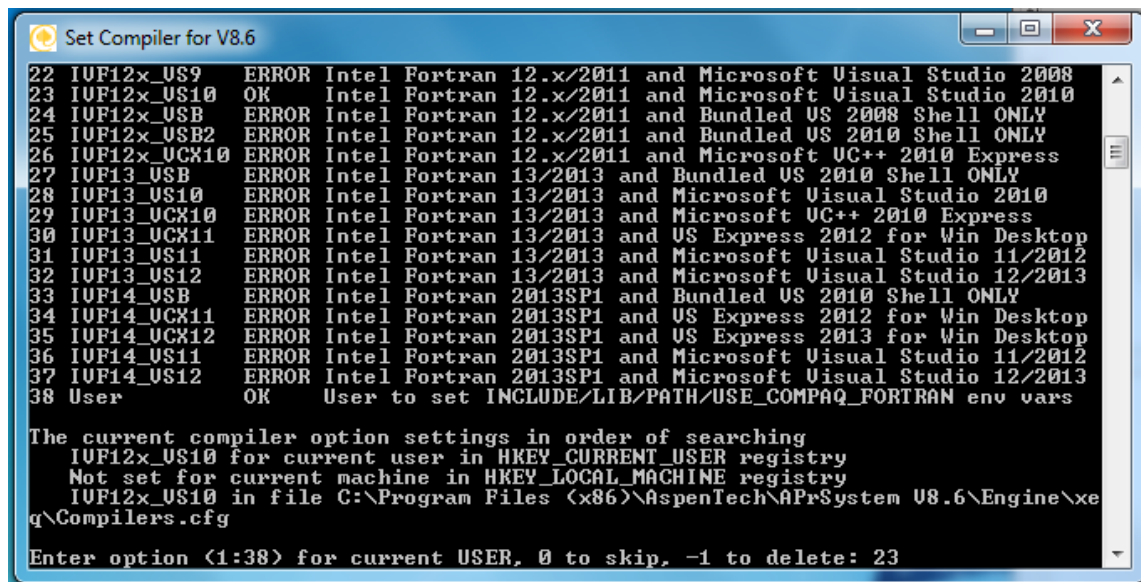
## **Fortranilla luotujen käyttäjämallien liittäminen Aspen Plus -simulaattoriin**

Seuraavassa esitetään ohje Fortranilla kirjoitetun aliohjelman kääntämiseen ja linkittämiseen Aspen Plus -työkirjaan. Kun simuloitaessa käytetään Fortranilla luotuja käyttäjämalleja, Aspen-työkirja ja kaikki siihen liittyvät tiedostot tallennetaan yhteen työkansioon. Työkansio tallennetaan tietokoneen C-levyllä ohjelmakansiossa sijaitsevaan Aspen Plus VX.X -kansioon (C:\ProgramData\AspenTech\Aspen Plus VX.X). Tätä sijaintia suositellaan käyttämään, sillä kääntäjä ei välttämättä kykene hakemaan työkansiota muista kohteista. Työkansion nimenä tässä ohjeessa toimii ”malli”.

Aliohjelma kirjoitetaan Fortran-kielellä, jota tukee tekstieditoreista esimerkiksi Microsoft Visual Studio. Fortran-koodin kääntämiseen vaaditaan Aspenin oma kääntäjä. Fortran-koodi muunnetaan kääntäjällä konekieliseksi objektitiedostoksi, jonka pääte on obj. Objektitiedostosta kääntäjän linkkeritoiminto muodostaa ohjelman, joka voidaan suorittaa Aspenilla. Tätä ohjelmaa kutsutaan dynaamiseksi linkkirjastoksi, josta käytetään lyhennettä DLL (Dynamic Link Library) ja jonka pääte on dll. (Anon. a)

### **Kääntäjän määrittäminen Aspen Plus -ohjelmalle**

Kääntäjä on ohjelma, joka muuntaa Fortran-koodin Aspenin ymmärtämään muotoon. Kääntäjä voidaan valita tietokoneen Ohjelmat-valikosta (Kaikki ohjelmat → AspenTech → Process Modeling → Process Modeling VX.X → Set Compiler for VX.X). Set Compiler for VX.X -tekstikäyttöliittymän ikkunassa on esitetty lista Fortran-kääntäjistä. Näistä kääntäjistä valitaan kääntäjä, jonka kohdalla lukee teksti OK. Kääntäjiä, joiden kohdalla lukee teksti ERROR, ei voida valita. Valitun kääntäjän numero kirjoitetaan tekstikäyttöliittymään ja painetaan Enter-näppäintä. Kääntäjän valitsin on esitetty kuvassa (1).



Kuva 1. Kääntäjän valitseminen Aspen Plus -simulaattorille.

## Fortran-tiedoston luominen

Fortran-tiedoston luomisessa voi käyttää hyväksi Aspenin valmiita Fortran-pohjia, jotka ovat löydettävissä User -kansioista (C:\Program Files (x86)\AspenTech\Aspen Plus X.X\Engine\User). Kineettisen mallin rakentamisessa voidaan käyttää usrkin.f -tiedostoa. Tiedosto kopioidaan ja tallennetaan samaan työkansioon Aspen-työkirjan kanssa, jossa aliohjelmalla on tarkoitus käyttää. Fortran-tiedoston pääte on f. Fortran-tiedostolle voi antaa minkä tahansa nimen, mutta aliohjelman nimi saa sisältää korkeintaan kuusi merkkiä. Kun aliohjelmalla on tarkoitus määrittää reaktioille kinetiikka, asetetaan aliohjelman nimeksi USRKIN, kuten kuvassa (2) on esitetty.

```

C      User Kinetics Subroutine for RCSTR, RPLUG, RBATCH, PRES-RELIEF,
C      RADFRAC and RATEFRAC (USER type Reactions)
C
SUBROUTINE USRKIN (SOUT,  NSUBS,  IDXSUB,  ITYPE,  NINT,
2          INT,  NREAL,  REAL,  IDS,  NPO,
3          NBOPST, NIWORK, IWORK,  NWORK,  WORK,
4          NC,  NR,  STOIC,  RATES,  FLUXM,
5          FLUXS, XCURR, NTCAT,  RATCAT,  NTSSAT,
6          RATSSA, KCALL, KFAIL,  KFLASH, NCOMP,
7          IDX,  Y,  X,  X1,  X2,
8          NRALL, RATALL, NUSERV,  USERV,  NINTR,
9          INTR,  NREALR, REALR,  NIWR,  IWR,
*          NWR,  WR,  NRL,  RATEL,  NRV,
1         RATEV)

```

Kuva 2. usrkin.f -tiedostopohja.

Aliohjelmassa voidaan kutsua common-tiedostoja, jotka välittävät tietoa muuttujista eri ohjelmayksiköiden välillä. Valmiita cmn-tiedostoja on löydettävissä *Custom*-kansiossa (C:\Program Files (x86)\AspenTech\Aspen Plus VX.X\Engine\Custom). Käyttäjäkinetiikka-aliohjelmaan sisällytetään ainakin dms\_maxwrt.cmn-tiedosto, joka välittää aliohjelman puolella määritellyt tulostukset Aspenin ohjauspöydälle (*Control Panel*). Ennen kuin cmn-tiedostoon voidaan viitata ohjelmassa, sitä on kutsuttava `#include "dms_maxwrt.cmn"` -komennolla, kuten kuvassa (3) on esitetty. cmn-tiedosto on kopioitava ja tallennettava samaan työkansioon Aspen-työkirjan ja aliohjelman kanssa, jotta aliohjelma löytää tiedoston.

```

C      BEGIN EXECUTABLE CODE

#include "dms_maxwrt.cmn"

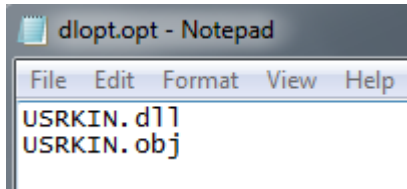
```

Kuva 3. Common-tiedoston kutsuminen Fortranissa.

### .opt -tiedoston luominen

Aspenissa aliohjelmaa kutsutaan Dynamic Linking Option -tiedoston (DLOPT) välityksellä. DLOPT-tiedosto luodaan jollakin tekstieditorilla, joka tuottaa raakatekstiä. Tiedostoon

kirjoitetaan allekkain dll- ja obj-tiedostojen nimet, kuten alla olevassa kuvassa (4) on esitetty.

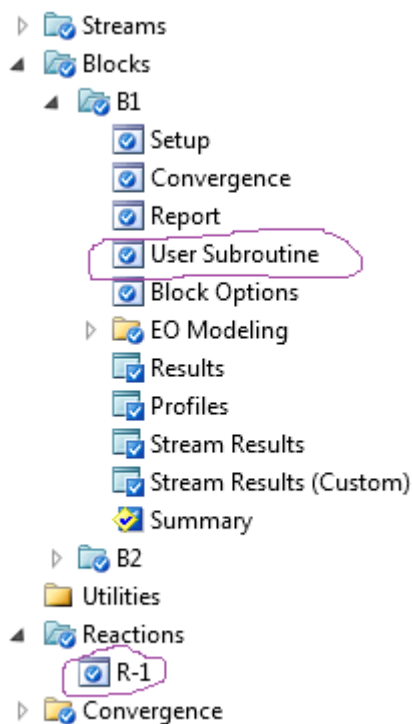


Kuva 4. opt. -tiedoston luominen.

DLOPT-tiedoston tiedostopäätteeksi vaihdetaan opt, jolloin Aspen tunnistaa sen. DLOPT-tiedosto tallennetaan samaan työkansioon kuin Aspen-työkirja ja aliohjelma, esimerkiksi dlopt.opt -nimellä.

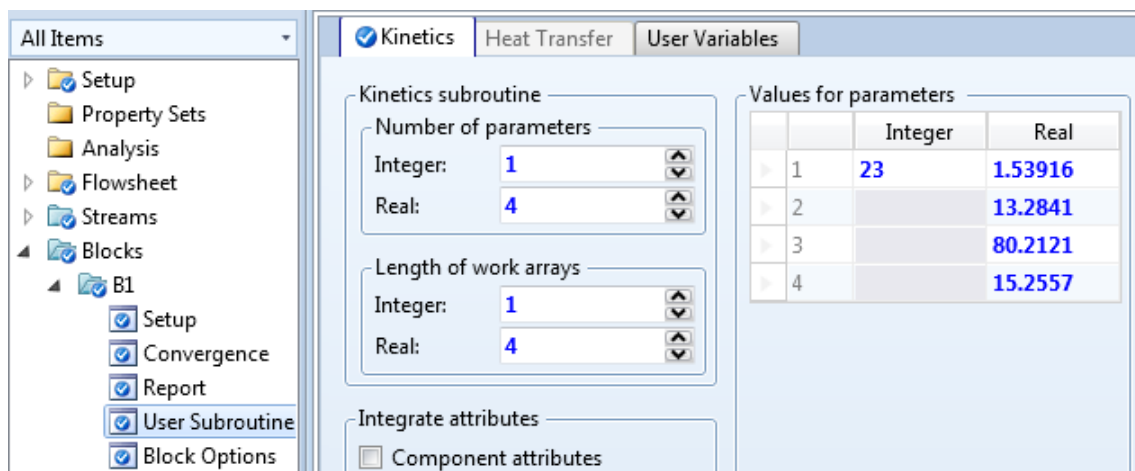
#### Aspen-työkirjaan tehtävät asetukset aliohjelman liittämistä varten

Aspenissa valitaan reaktorimalli, jossa on mahdollista käyttää reaktiolle käyttäjän määrittelemää kinetiikkaa. Tällainen reaktorimalli on esimerkiksi RBatch. Aliohjelman liittämiseksi simulointiin, on aliohjelmaan viitattava sekä *Blocks*-valikon reaktoriblokissa että *Reactions*-valikossa kyseessä olevassa reaktioblokissa, kuten kuvaan (5) on merkitty.



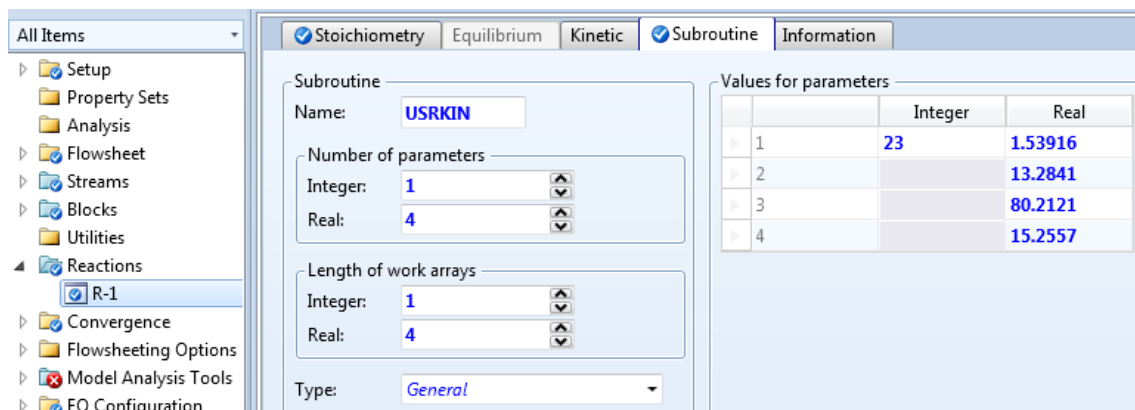
Kuva 5. Kohteet, joissa käyttäjäkinetiikka määritellään.

*RBatch*-blokissa on *User Subroutine*-valikko, jonne määritellään *Kinetics*-välilehdelle parametrien lukumäärä. Aliohjelmaa varten määritellään kokonaisluku- ja reaalityyppisten parametrien lukumäärät, sekä työmatriisien pituudet. Työmatriisien pituudet voidaan asettaa samoiksi kuin parametrien lukumäärät. Kumpaakin parametrityyppiä on oltava vähintään yksi. *Values for parameters* -taulukkoon aktivoituu edellä määriteltyjen parametrien lukumäärien perusteella soluja, joihin voidaan syöttää alkuarvot parametreille. Esimerkki tästä on esitetty kuvassa (6).



Kuva 6. Parametrien lukumäärien ja alkuarvojen määrittely reaktoriblokissa.

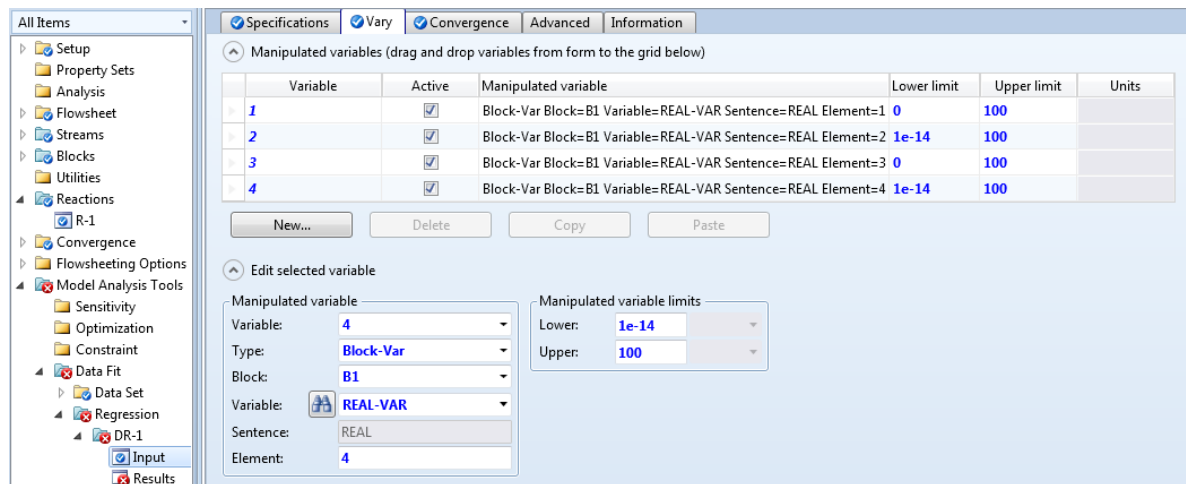
Reaktiota määriteltäessä valitaan reaktiotyypiksi USER. Tällöin Aspen luo reaktioblokkiin *Subroutine*-välilehden. *Subroutine*-välilehdellä kirjoitetaan Subroutine → Name -soluun aliohjelman nimi, esimerkiksi USRKIN, kuten kuvassa (7) on esitetty. Parametrien lukumäärät ja työmatriisien pituudet määritellään samoin kuin edellä reaktoriblokissa. Parametreille annetaan alkuarvot parametritaulukossa.



Kuva 7. Aliohjelman sekä parametrien lukumäärien ja alkuarvojen määrittely reaktioblokissa.

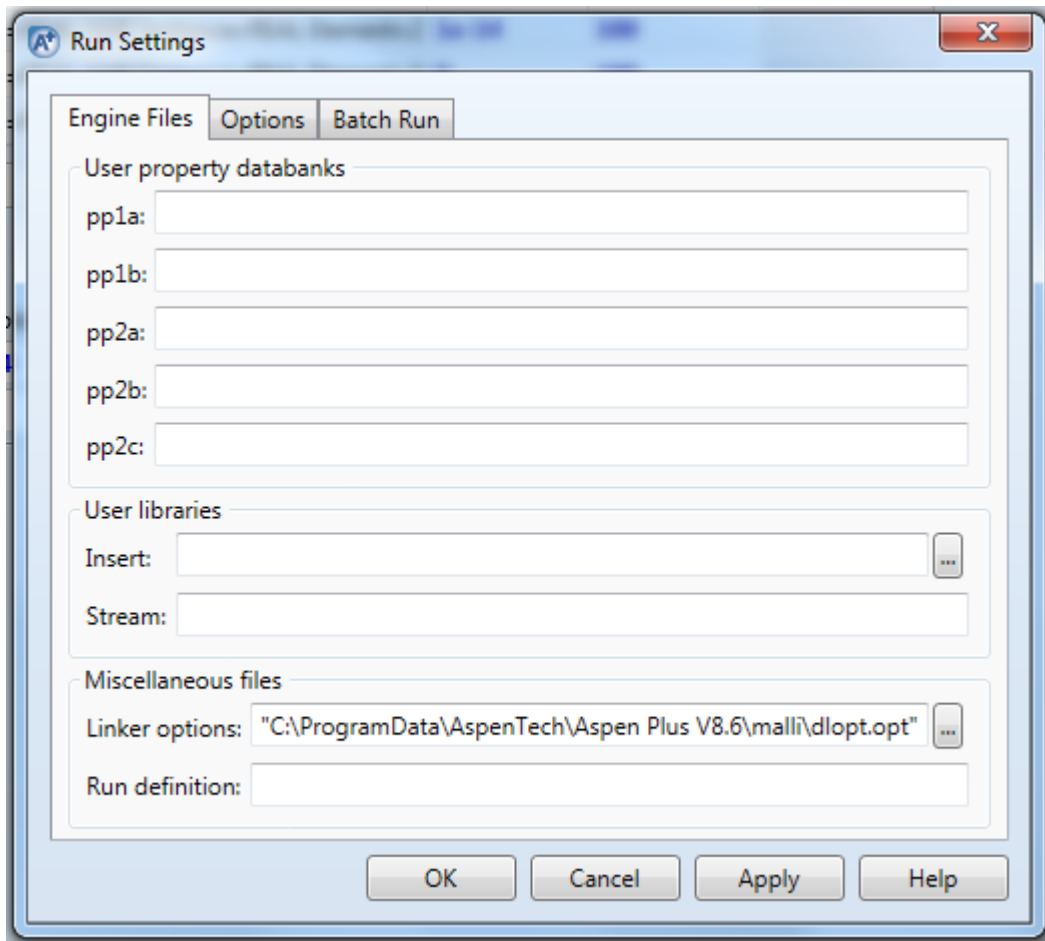
Kun aliohjelmassa määritellyn kineettisen yhtälön parametreja on tarkoitus sovittaa dataan, voidaan *Regression*-blokissa määritellä iteroitavat parametrit. Sovitettavien parametrien määrittely suoritetaan Vary-välilehdellä. Manipuloitavan parametrin tyypiksi valitaan vetovalikosta BLOCK-VAR. Jos tarkoituksena on iteroida kokonaislukumuuttujaa, valitaan

muuttujaksi INT-VAR. Käyttäjäkokemuksien perusteella Aspen ei kuitenkaan käytännössä kykene muuttamaan kokonaislukuparametrin arvoa, vaan niiden arvot on iteroitava käsin. Reaaliparametria iteroidessa valitaan muuttujaksi REAL-VAR. *Element*-soluun kirjoitetaan parametrin numero, joka viittaa parametrin numeroon reaktoriblokin ja reaktioblokin *Values for parameters* -taulukossa. Iteroitavien parametrien arvoille on suositeltavaa asettaa rajat, jotka estävät esimerkiksi nollalla jaon Fortranissa. Edellä mainitut toimenpiteet on esitetty kuvassa (8).



Kuva 8. Sovitettavien parametrien määrittely.

Jotta Aspen kykenee löytämään aliohjelman, on ohjelmatiedostoon viitattava *Customize*-valikossa, kuten kuvassa (9) on esitetty. *Options*-painikkeesta avautuu *Run Settings*-ikkuna, jonka *Linker options* -solussa määritellään tiedostopolku työkansioon ja DLOPT-tiedostoon: "C:\ProgramData\AspenTech\Aspen Plus VX.X\malli\dlopt.opt".



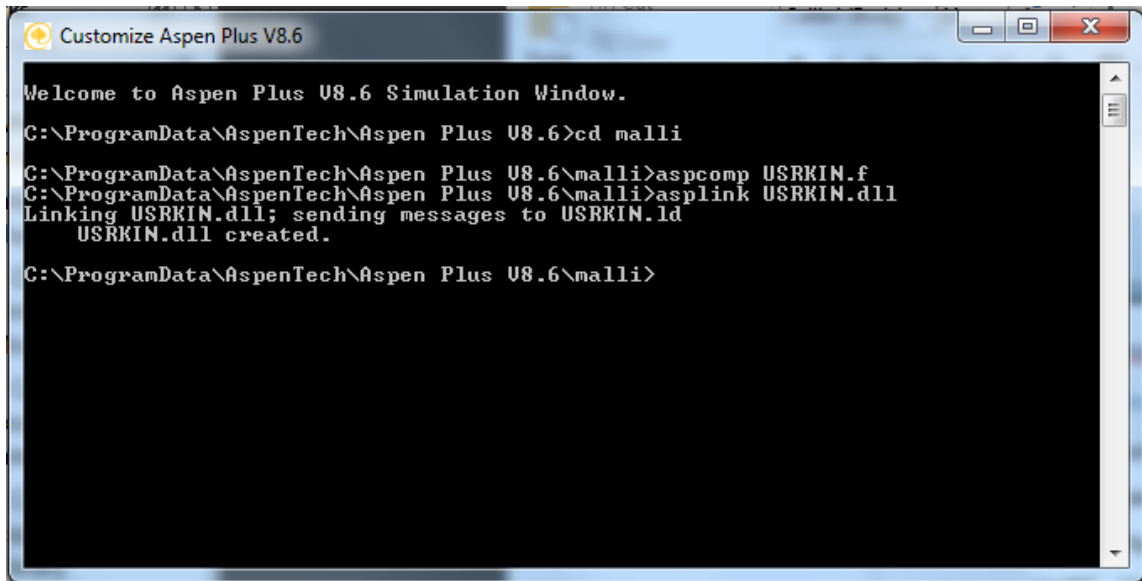
Kuva 9. Aliohjelmaan viittaaminen *Run Settings* -ikkunassa.

### Aliohjelman kääntäminen ja liittäminen simulointiin

Ennen Fortran-koodin kääntämistä on suositeltavaa sulkea Aspen-työkirja. Kääntäminen suoritetaan edellä määritellyllä kääntäjällä, jonka tekstikäyttöliittymä voidaan avata tietokoneen *Ohjelmat*-valikosta. Käyttöliittymään kirjoitetaan (lainausmerkkejä ei kirjoiteta) *"cd kansion nimi"*, tässä tapauksessa *"cd malli"*. Käsky avaa työkansion, jossa Fortran-tiedosto ja Aspen-työkirja sijaitsevat. Seuraavaksi käyttöliittymään kirjoitetaan *"aspcomp USRKIN.f"*. Tämä käsky kääntää Fortran-koodin Aspenin ymmärtämään muotoon ja luo USRKIN.obj-objektitiedoston. Lopuksi kirjoitetaan käsky *"asplink USRKIN.dll"*, joka muodostaa objektitiedostosta dynaamisen linkkikirjaston eli DLL-tiedoston. dll-pääte on



kirjoitettava pienillä kirjaimilla, muuten kääntäjä ei tunnista sitä. Kun DLL-tiedosto on muodostettu, voidaan Fortran-tiedoston koodia muokata ilman, että se vaikuttaa DLL-tiedoston toimintaan. Jos DLL-tiedostoon on tehtävä muutoksia, muutokset kirjoitetaan Fortran tiedostoon ja tiedosto käännetään uudelleen. Edellä kuvatut toimenpiteet on esitetty kuvassa (10).



```
Customize Aspen Plus V8.6

Welcome to Aspen Plus V8.6 Simulation Window.

C:\ProgramData\AspenTech\Aspen Plus V8.6>cd malli
C:\ProgramData\AspenTech\Aspen Plus V8.6\malli>aspcomp USRKIN.f
C:\ProgramData\AspenTech\Aspen Plus V8.6\malli>asplink USRKIN.dll
Linking USRKIN.dll; sending messages to USRKIN.ld
USRKIN.dll created.

C:\ProgramData\AspenTech\Aspen Plus V8.6\malli>
```

Kuva 10. Fortran-tiedoston kääntäminen sekä linkittäminen.

Jos aspcomp-käskystä seuraa virheilmoituksia, ne johtuvat normaalisti Fortran-koodissa olevasta virheestä. Tällöin kannattaa tarkistaa, että kaikki muuttujat ja parametrit on määriteltä. Virheilmoitus voi seurata myös, mikäli jonkin rivin loppuun on kirjoitettu pilkku, mutta koodia ei ole määriteltä \*- tai + -merkin avulla jatkumaan seuraavalta riviltä. Myös tekstin sijoittuminen sarakkeisiin, laskutoimitukset ja sulkujen sijoittelu kannattaa virheilmoitustapauksissa tarkistaa.

Joskus asplink -käskyä seuraa ilmoitus "Link Failure". Tällöin on suositeltavaa varmistaa, ettei Aspen-työkirja ole auki. Jos työkirjan sulkeminen ei poista ongelmaa, on mahdollista, että jokin Aspenin prosessi on edelleen käynnissä taustalla. Tämä on yleistä silloin, kun simulointi on kaatunut aikaisemmin. Tällöin kannattaa Aspenin prosessit sulkea erikseen tietokoneen Task Manager-valikosta Processes -välilehdellä. Aspen-simulointiin liittyviä prosesseja ovat apmain.exe ja sqlservr.exe. Näiden prosessien päättäminen poistaa

normaalisti ongelman. Jos virheilmoitus kuitenkin ilmestyy kaikista edellä mainituista toimenpiteistä huolimatta, on tietokone käynnistettävä uudelleen.

Joskus Aspen ei käytä päivitettyä versiota DLL-tiedostosta, vaan päivityksen jälkeen Aspenin muistiin on jäänyt vanha koodi. Ongelma eliminoiduu simuloimalla prosessi kerran läpi ja käynnistämällä Aspen sitten uudelleen.

## Fortran-koodi kinetiikalle

```

C$ #2 BY: PATNAIK DATE: 14-NOV-1998 INCLUDE COMMONS FOR RADFRAC/RATEFRAC
C$ #1 BY: ANAVI DATE: 1-JUL-1994 NEW FOR USER MODELS
C
C      User Kinetics Subroutine for RCSTR, RPLUG, RBATCH, PRES-RELIEF,
C      RADFRAC and RATEFRAC (USER type Reactions)
C
      SUBROUTINE USRKIN (SOUT,  NSUBS,  IDXSUB,  ITYPE,  NINT,
2          INTX,    NREAL,  REALX,    IDS,    NPO,
3          NBOPST, NIWORK, IWORK,    NWORK,  WORK,
4          NC,     NR,     STOIC,    RATES,  FLUXM,
5          FLUXS,  XCURR,  NTCAT,    RATCAT, NTSSAT,
6          RATSSA, KCALL,  KFAIL,    KFLASH, NCOMP,
7          IDX,   Y,      X,        X1,    X2,
8          NRALL, RATALL, NUSERV,   USERV,  NINTR,
9          INTR,  NREALR, REALR,    NIWR,   IWR,
*          NWR,  WR,     NRL,      RATEL,  NRV,
1         RATEV)
C
      IMPLICIT NONE
C
C      DECLARE VARIABLES USED IN DIMENSIONING
C
      INTEGER NSUBS, NINT,  NPO,    NIWORK,NWORK,
+          NC,     NR,     NTCAT, NTSSAT,NCOMP,
+          NRALL, NUSERV,NINTR, NREALR,NIWR,
+          NWR
C
C.....RCSTR...
#include "rcst_rcstri.cmn"
#include "rxn_rcstrr.cmn"
C
C.....RPLUG...
#include "rplg_rplugi.cmn"
#include "rplg_rplugr.cmn"
C
C.....RBATCH...
#include "rbtc_rbati.cmn"
#include "rbtc_rbatr.cmn"
C
C.....PRES-RELIEF...
#include "prsr_presri.cmn"
#include "rbtc_presrr.cmn"
C
C.....RADFRAC/RATEFRAC
#include "rxn_disti.cmn"
#include "rxn_distr.cmn"
C
C.....REACTOR (OR PRES-RELIEF VESSEL OR STAGE) PROPERTIES...
#include "rxn_rprops.cmn"
      EQUIVALENCE (TEMP, RPROPS_UTEMP)
      EQUIVALENCE (PRES, RPROPS_UPRES)
C      EQUIVALENCE (VFRAC, RPROPS_UVFRAC)
      EQUIVALENCE (BETA, RPROPS_UBETA)
C      EQUIVALENCE (VVP, RPROPS_UVVP)

```

```

C      EQUIVALENCE (VLIQ, RPROPS_UVLIQ)
C      EQUIVALENCE (VLIQS, RPROPS_UVLIQS)

      EQUIVALENCE (VOLR, RBATR_VOLRB)

C
C      INITIALIZE RATES
C
C      DECLARE ARGUMENTS
C
      INTEGER IDXSUB(NSUBS), ITYPE(NSUBS), INTX(NINT),
+      IDS(2), NBOPST(6, NPO), IWORK(NIWORK),
+      IDX(NCOMP), INTR(NINTR), IWR(NIWR),
+      NREAL, KCALL, KFAIL, KFLASH, NRL,
+      NRV, I
      REAL*8 SOUT(1), WORK(NWORK),
+      STOIC(NC, NSUBS, NR), RATES(1),
+      FLUXM(1), FLUXS(1), RATCAT(NTCAT),
+      RATSSA(NTSSAT), Y(NCOMP),
+      X(NCOMP), X1(NCOMP), X2(NCOMP)
      REAL*8 RATALL(NRALL), USERV(NUSERV),
+      REALR(NREALR), WR(NWR), RATEL(1),
+      RATEV(1), XCURR

C
C      DECLARE LOCAL VARIABLES
C
      INTEGER IMISS
      REAL*8 REALX(NREAL), RMISS, XLEN, DIAM, TEMP,
+      PRES, VFRAC, BETA, VVAP, VLIQ,
+      VLIQS, RRATE, KPAR, VOLR, DEX, ETH, LYS, PRATE, MYMAX,
+      MYY, QMAX, QUU, KSX, KSP, KI, KIP, ALPH, BET, SIX, SIP,
+      KJ, SO, EKSP, SSAT, PSAT, KPP, PXM, PM, PMP, KP, KS, KPX

C
C      BEGIN EXECUTABLE CODE

#include "dms_maxwrt.cmn"

      DO 100 I = 1, NC
        RATES(I) = 0D0
100  CONTINUE

      IF (INTX(1) .EQ. 1) THEN !Monod
        MYMAX=REALX(1)
        KSX=REALX(2)
        QMAX=REALX(3)
        KSP=REALX(4)
        DEX=X(1)
        ETH=X(2)
        LYS=X(5)
        IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
          RATES(6)=0
          RATES(2)=0
          RATES(1)=0
          RATES(3)=0
          RATES(4)=0
          RATES(5)=0
        ELSE
          MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))

```

```

        QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 2) THEN !Aiba (substr.-inhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KI=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KSP=REALX(5)
    KIP=REALX(6)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MY=MYMAX*DEX/(DEX+KSX)*EXP(-DEX/KI)
        QUU=QMAX*DEX/(DEX+KSP)*EXP(-DEX/KIP)
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 3) THEN !Andrews (substr.-inhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KI=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KSP=REALX(5)
    KIP=REALX(6)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MY=MYMAX*DEX/((DEX+KSX)*(1+DEX/KI))
        QUU=QMAX*DEX/((DEX+KSP)*(1+DEX/KIP))
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF

```

```

END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 4) THEN !Haldane (substr.-inhib.)
  MYYMAX=REALX(1)
  KSX=REALX(2)
  KI=REALX(3)
  QMAX=REALX(4)
  KSP=REALX(5)
  KIP=REALX(6)
  DEX=X(1)
  ETH=X(2)
  LYS=X(5)
  IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0
    RATES(2)=0
    RATES(1)=0
    RATES(3)=0
    RATES(4)=0
    RATES(5)=0
  ELSE
    MYY=MYMAX*DEX/(KSX+DEX+DEX**2/KI)
    QUU=QMAX*DEX/(KSP+DEX+DEX**2/KIP)
    RATES(5)=MY*LYS
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
  END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 5) THEN !Han ja Levenspiel (substr.-inhib.)
  MYYMAX=REALX(1)
  KSX=REALX(2)
  KI=REALX(3)
  QMAX=REALX(4)
  KSP=REALX(5)
  KIP=REALX(6)
  ALPH=INTX(2)/1.
  BET=INTX(3)/1.
  DEX=X(1)
  ETH=X(2)
  LYS=X(5)
  IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0
    RATES(2)=0
    RATES(1)=0
    RATES(3)=0
    RATES(4)=0
    RATES(5)=0
  ELSE
    MYY=MYMAX*(1-DEX/KI)**ALPH*DEX/(DEX+KSX*(1-DEX/KI)**BET)
    QUU=QMAX*(1-DEX/KIP)**ALPH*DEX/(DEX+KSP*(1-DEX/KIP)**BET)
    RATES(5)=MY*LYS
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
  END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 6) THEN !Luong (substr.-inhib.)
  MYYMAX=REALX(1)
  KSX=REALX(2)

```

```

KI=REALX(3)
QMAX=REALX(4)
KSP=REALX(5)
KIP=REALX(6)
ALPH=INTX(2)/1.
DEX=X(1)
ETH=X(2)
LYS=X(5)
IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0
    RATES(2)=0
    RATES(1)=0
    RATES(3)=0
    RATES(4)=0
    RATES(5)=0
ELSE
    MYY=MYMAX*DEX/(DEX+KSX)*(1-DEX/KI)**ALPH
    QUU=QMAX*DEX/(DEX+KSP)*(1-DEX/KIP)**ALPH
    RATES(5)=MYY*LYS
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 7) THEN !Orhon ja Tunay (substr.-inhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KI=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KSP=REALX(5)
    KIP=REALX(6)
    SIX=REALX(7)
    SIP=REALX(8)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MYY=MYMAX*DEX/(KSX+DEX+DEX*SIX/KI)
        QUU=QMAX*DEX/(KSP+DEX+DEX*SIP/KIP)
        RATES(5)=MYY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 8) THEN !Yano ja Koga (substr.-inhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    QMAX=REALX(3)
    KSP=REALX(4)
    KJ=REALX(5)

```

```

EKSP=INTX(2)/1.0
DEX=X(1)
ETH=X(2)
LYS=X(5)
IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0
    RATES(2)=0
    RATES(1)=0
    RATES(3)=0
    RATES(4)=0
    RATES(5)=0
ELSE
    MYY=MYMAX/(1+KSX/DEX+(DEX/KJ)**EKSP)
    QUU=QMAX/(1+KSP/DEX+(DEX/KJ)**EKSP)
    RATES(5)=MYX*LYS
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 9) THEN !Sivakumar (substr.-inhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KI=REALX(2)
    KSX=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KSP=REALX(5)
    KIP=REALX(6)
    SO=REALX(7)
    ALPH=INTX(2)/1.0
    BET=INTX(3)/1.0
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MYY=MYMAX*(1-DEX/KI)**ALPH*DEX/(DEX+KSX*(1-DEX/SO)**BET)
        QUU=QMAX*(1-DEX/KIP)**ALPH*DEX/(DEX+KSP*(1-DEX/SO)**BET)
        RATES(5)=MYX*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 10) THEN !Contoise
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    QMAX=REALX(3)
    KSP=REALX(4)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN

```



```

      RATES(6)=0
      RATES(2)=0
      RATES(1)=0
      RATES(3)=0
      RATES(4)=0
      RATES(5)=0
ELSE
      MYY=MYMAX*(DEX/(DEX+KSX*LYS))
      QUU=QMAX*(DEX/(DEX+KSP*LYS))
      RATES(5)=MYY*LYS
      RATES(2)=QUU*LYS
      RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
      RATES(3)=RATES(2)
      RATES(4)=0
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 11) THEN !Moser
      MYMAX=REALX(1)
      KSX=REALX(2)
      QMAX=REALX(3)
      KSP=REALX(4)
      EKSP=INTX(2)/1.0
      DEX=X(1)
      ETH=X(2)
      LYS=X(5)
      IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
            RATES(6)=0
            RATES(2)=0
            RATES(1)=0
            RATES(3)=0
            RATES(4)=0
            RATES(5)=0
      ELSE
            MYY=MYMAX*DEX**EKSP/(KSX+DEX**EKSP)
            QUU=QMAX*DEX**EKSP/(KSP+DEX**EKSP)
            RATES(5)=MYY*LYS
            RATES(2)=QUU*LYS
            RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
            RATES(3)=RATES(2)
            RATES(4)=0
      END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 12) THEN !Tessier
      MYMAX=REALX(1)
      KS=REALX(2)
      QMAX=REALX(3)
      KSP=REALX(4)
      DEX=X(1)
      ETH=X(2)
      LYS=X(5)
      IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
            RATES(6)=0
            RATES(2)=0
            RATES(1)=0
            RATES(3)=0
            RATES(4)=0
            RATES(5)=0
      ELSE
            MYY=MYMAX*(1-EXP(-(DEX/KS)))
            RATES(5)=MYY*LYS

```

```

        RATES(2)=QMAX*(1-EXP(-DEX/KSP))*LYS
        RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 13) THEN !Andrews ja Noack (yhdist.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KI=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KSP=REALX(5)
    KIP=REALX(6)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MY=MYMAX*DEX/(1+KSX/DEX+DEX/KI)
        QUU=QMAX*DEX/(1+KSP/DEX+DEX/KIP)
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 14) THEN !Goncalves (yhdist.)
    MYMAX=REALX(1)
    SSAT=REALX(2)
    PSAT=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    ALPH=INTX(2)/1.
    BET=INTX(3)/1.
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MY=MYMAX*(1-DEX/SSAT)**ALPH*(1-ETH/PSAT)**BET
        QUU=QMAX*(1-DEX/SSAT)**ALPH*(1-ETH/PSAT)**BET
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 15) THEN !Heuvel ja Beeftink (yhdist.)

```

```

MYMAX=REALX(1)
KSX=REALX(2)
KI=REALX(3)
KP=REALX(4)
QMAX=REALX(5)
KSP=REALX(6)
KIP=REALX(7)
KPP=REALX(8)
DEX=X(1)
ETH=X(2)
LYS=X(5)
IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0
    RATES(2)=0
    RATES(1)=0
    RATES(3)=0
    RATES(4)=0
    RATES(5)=0
ELSE
    MYY=MYMAX*DEX/(KSX+DEX+DEX**2/KI)*(KP/(KP+ETH))
    QUU=QMAX*DEX/(KSP+DEX+DEX**2/KIP)*(KPP/(KPP+ETH))
    RATES(5)=MY*LYS
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 16) THEN !Phisalaphong (yhdist.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KI=REALX(3)
    KP=REALX(4)
    QMAX=REALX(5)
    KSP=REALX(6)
    KIP=REALX(7)
    KPP=REALX(8)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MYY=MYMAX*DEX/(KSX+DEX+DEX**2/KI)*(1-ETH/KP)
        QUU=QMAX*DEX/(KSP+DEX+DEX**2/KIP)*(1-ETH/KPP)
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 17) THEN !Aiba (tuoteinhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)

```

```

KP=REALX(3)
QMAX=REALX(4)
KSP=REALX(5)
KPP=REALX(6)
DEX=X(1)
ETH=X(2)
LYS=X(5)
IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0
    RATES(2)=0
    RATES(1)=0
    RATES(3)=0
    RATES(4)=0
    RATES(5)=0
ELSE
    MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))*EXP(-KP*ETH)
    RATES(5)=MYY*LYS
    QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*EXP(-KPP*ETH)
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 18) THEN !Ghose ja Tyagi (tuoteinhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    PXM=REALX(2)
    QMAX=REALX(3)
    PM=REALX(4)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        IF (PM .GT. ETH) THEN
            IF (PXM .GT. ETH) THEN
                MYY=MYMAX*(1-ETH/PXM)
                QUU=QMAX*(1-ETH/PM)
                RATES(5)=MYY*LYS
                RATES(2)=QUU*LYS
                RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
                RATES(3)=RATES(2)
                RATES(4)=0
            ELSE
                PXM=ETH
                MYY=MYMAX*(1-ETH/PXM)
                QUU=QMAX*(1-ETH/PM)
                RATES(5)=MYY*LYS
                RATES(2)=QUU*LYS
                RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
                RATES(3)=RATES(2)
                RATES(4)=0
            END IF
        END IF
        FORMAT ('PXM<ETH' F10.5)
    END IF
END IF

```

```

        WRITE (MAXWRT_MAXBUF, 1000) PXM
        CALL DMS_WRTTRM(1)
    END IF
ELSE
    PM=ETH
    MYY=MYMAX*(1-ETH/PXM)
    QUU=QMAX*(1-ETH/PM)
    RATES(5)=MY*LYS
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
1100    FORMAT ('PM<ETH' F10.5)
        WRITE (MAXWRT_MAXBUF, 1100) PM
        CALL DMS_WRTTRM(1)
    END IF
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 19) THEN !Hinshelwood (tuoteinhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KPX=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KSP=REALX(5)
    KPP=REALX(6)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))*(1-KPX*ETH)
        QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*(1-KPP*ETH)
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(5)=MY*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 20) THEN !Jerusalimsky (tuoteinhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    KI=REALX(3)
    QMAX=REALX(4)
    KIP=REALX(5)
    KSP=REALX(6)
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(6)=0
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0

```

```

        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MYY=MYMAX*DEX/(KSX+DEX)*(KI/(KI+ETH))
        QUU=QMAX*DEX*KIP/((KSP+DEX)*(KIP+ETH))
        RATES(5)=MYY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 21) THEN !Levenspiel (tuoteinhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    QMAX=REALX(3)
    KSP=REALX(4)
    PM=REALX(5)
    EKSP=INTX(2)/1.
    DEX=X(1)
    ETH=X(2)
    LYS=X(5)
    IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        IF (PM .GT. ETH) THEN
            MYY=MYMAX*(DEX/KSX)*(1-(ETH/PM))**EKSP
            QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*(1-(ETH/PM))**EKSP
            RATES(2)=QUU*LYS
            RATES(5)=MYY*LYS
            RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
            RATES(3)=RATES(2)
            RATES(4)=0
        ELSE
            PM=ETH
            MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))*(1-(ETH/PM))**1
            RATES(5)=MYY*LYS
            RATES(2)=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*(1-(ETH/PM))**1
            RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
            RATES(3)=RATES(2)
            RATES(4)=0
            FORMAT ('PM<ETH' F10.5)
            WRITE (MAXWRT_MAXBUF, 1200) PM
            CALL DMS_WRTTRM(1)
        END IF
    END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 22) THEN !Luong (tuoteinhib.)
    MYMAX=REALX(1)
    KSX=REALX(2)
    QMAX=REALX(3)
    KSP=REALX(4)
    PM=REALX(5)
    PMP=REALX(6)
    EKSP=INTX(2)/1.
    DEX=X(1)

```

```

ETH=X(2)
LYS=X(5)
IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
  RATES(6)=0
  RATES(2)=0
  RATES(1)=0
  RATES(3)=0
  RATES(4)=0
  RATES(5)=0
ELSE
  IF (PM .GT. ETH) THEN
    IF (PMP .GT. ETH) THEN
      MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))*(1-(ETH/PM)**EKSP)
      QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*(1-(ETH/PMP))
      RATES(2)=QUU*LYS
      RATES(5)=MYY*LYS
      RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
      RATES(3)=RATES(2)
      RATES(4)=0
    ELSE
      PMP=ETH
      MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))*(1-(ETH/PM)**EKSP)
      QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*(1-(ETH/PMP))
      RATES(2)=QUU*LYS
      RATES(5)=MYY*LYS
      RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
      RATES(3)=RATES(2)
      RATES(4)=0
      1300  FORMAT ('PMP<ETH' F10.5)
      WRITE (MAXWRT_MAXBUF, 1300) PMP
      CALL DMS_WRTTRM(1)
    END IF
  ELSE
    PM=ETH
    MYY=MYMAX*(DEX/(KSX+DEX))*(1-(ETH/PM)**EKSP)
    QUU=QMAX*(DEX/(KSP+DEX))*(1-(ETH/PMP))
    RATES(2)=QUU*LYS
    RATES(5)=MYY*LYS
    RATES(1)=- (RATES(5)+RATES(2)/2)
    RATES(3)=RATES(2)
    RATES(4)=0
    1400  FORMAT ('PM<ETH' F10.5)
    WRITE (MAXWRT_MAXBUF, 1400) PM
    CALL DMS_WRTTRM(1)
  END IF
END IF
ELSE IF (INTX(1) .EQ. 23) THEN !Taylor (tuoteinhib.)
  MYMAX=REALX(1)
  KSX=REALX(2)
  KP=REALX(3)
  QMAX=REALX(4)
  KPP=REALX(5)
  KSP=REALX(6)
  DEX=X(1)
  ETH=X(2)
  LYS=X(5)
  IF (DEX .LT. 0.00001) THEN
    RATES(6)=0

```

```

        RATES(2)=0
        RATES(1)=0
        RATES(3)=0
        RATES(4)=0
        RATES(5)=0
    ELSE
        MYY=MYMAX*DEX*((KSX+DEX)*(1-ETH)/KP)
        QUU=QMAX*DEX*((KSP+DEX)*(1-ETH)/KPP)
        RATES(5)=MYY*LYS
        RATES(2)=QUU*LYS
        RATES(1)=-(RATES(5)+RATES(2)/2)
        RATES(3)=RATES(2)
        RATES(4)=0
    END IF
END IF

C 1=dextrose
C 2=ethanol
C 3=CO2
C 4=vesi
C 5=hiiva (=dekstroosi)

RETURN
END

```



## Malleille sovitettujen parametrien arvot

Taulukko 1. Levenspielin, Luongin ja Aiban malleille datojen 1 ja 2 mukaan sovitettujen parametrien arvot.

Malli	Parametri	Sovitus	
		Data 1	Data 2
<b>Levenspiel</b>	$\mu_{\max}$	1,7571	0,0358
	$K_{SX}$	12,3000	12,1680
	$q_{\max}$	67,3960	0,0022
	$K_{SP}$	10,2600	0,0145
	$P_{\max}$	0,0345	0,1735
<b>Luong</b>	$\mu_{\max}$	1,7	0,2723
	$K_{SX}$	100	87,3248
	$q_{\max}$	3,8600	0,0022
	$K_{SP}$	2,4798	0,0188
	$P_{X\max}$	0,04	0,0406
	$P_{P\max}$	0,04	33,0168
	$\alpha$	2	1
<b>Aiba</b>	$\mu_{\max}$	1,1076	0,3973
	$K_{SX}$	36,8846	130,5976
	$K_P$	85,9430	0,0173
	$q_{\max}$	158,2912	0,1598
	$K_{SP}$	47,5256	2,5015
	$K_{PP}$	122,2619	0,0008

## Malleille sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisit

Taulukko 1. Levenspielin lopputuoteinhibitiomallille datan 1 perusteella sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisi.

	$\mu_{\max}$	$K_{SX}$	$q_{\max}$	$K_{SP}$	$P_{\max}$
$\mu_{\max}$	1				
$K_{SX}$	0.524	1			
$q_{\max}$	-1	-0.525	1		
$K_{SP}$	-0.506	-0.402	0.507	1	
$P_{\max}$	-1	-0.518	1	0.496	1

Taulukko 2. Luongin lopputuoteinhibitiomallille datan 1 perusteella sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisi.

	$\mu_{\max}$	$K_{SX}$	$q_{\max}$	$K_{SP}$	$P_{X\max}$	$P_{P\max}$
$\mu_{\max}$	1					
$K_{SX}$	-0.909	1				
$q_{\max}$	-0.848	0.857	1			
$K_{SP}$	-1	0.909	0.848	1		
$P_{X\max}$	-0.237	0.552	0.188	0.237	1	
$P_{P\max}$	-0.710	0.600	0.597	0.710	-0.112	1

Taulukko 3. Aiban lopputuoteinhibitiomallille datan 1 perusteella sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisi.

	$\mu_{\max}$	$K_{SX}$	$K_P$	$q_{\max}$	$K_{SP}$	$K_{PP}$
$\mu_{\max}$	1					
$K_{SX}$	1	1				
$K_P$	0.270	0.270	1			
$q_{\max}$	0.096	0.096	-0.711	1		
$K_{SP}$	0.096	0.096	-0.711	1	1	
$K_{PP}$	-0.638	-0.638	-0.230	-0.277	-0.277	1

Taulukko 4. Levenspielin lopputuoteinhibitiomallille datan 2 perusteella sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisi.

	$\mu_{\max}$	$K_{SX}$	$q_{\max}$	$K_{SP}$	$P_{\max}$
$\mu_{\max}$	1				
$K_{SX}$	1	1			
$q_{\max}$	-0.358	-0.342	1		
$K_{SP}$	-0.364	-0.349	1	1	
$P_{\max}$	-0.382	-0.367	0.993	0.994	1

Taulukko 5. Luongin lopputuoteinhibitiomallille datan 2 perusteella sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisi.

	$\mu_{\max}$	$K_{SX}$	$q_{\max}$	$K_{SP}$	$P_{X\max}$	$P_{P\max}$
$\mu_{\max}$	1					
$K_{SX}$	1	1				
$q_{\max}$	-0.603	-0.599	1			
$K_{SP}$	-0.584	-0.581	0.998	1		
$P_{X\max}$	-0.068	-0.065	0.821	0.842	1	
$P_{P\max}$	0.778	0.780	-0.064	-0.064	0.383	1

Taulukko 6. Aiban lopputuoteinhibitiomallille datan 2 perusteella sovitettujen parametrien korrelaatiomatriisi.

	$\mu_{\max}$	$K_{SX}$	$K_P$	$q_{\max}$	$K_{SP}$	$K_{PP}$
$\mu_{\max}$	1					
$K_{SX}$	0.414	1				
$K_P$	0.788	-0.199	1			
$q_{\max}$	0.178	-0.526	0.566	1		
$K_{SP}$	0.290	-0.504	0.667	0.990	1	
$K_{PP}$	-0.468	0.235	-0.747	-0.359	-0.455	1